



REQU. 04 JUIN 2004

OMPI

PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

20 FEV. 2004

Fait à Paris, le _____

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

BEST AVAILABLE COPY

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 0 W / 210502

REMISE DES PIÈCES DATE 19 FEV 2003 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0302021 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE 19 FEV. 2003 PAR L'INPI		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE BECKER ET ASSOCIES 35 rue des Mathurins 75008 PARIS	
Vos références pour ce dossier (facultatif) B0189FR			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° _____ Date _____	
ou demande de certificat d'utilité initiale		N° _____ Date _____	
Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale		<input type="checkbox"/> N° _____ Date _____	
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Méthodes et compositions pour le traitement de pathologies dégénératives oculaires.			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		ExonHit Therapeutics SA	
Prénoms			
Forme juridique		Société Anonyme	
N° SIREN		414488171	
Code APE-NAF			
Domicile ou siège	Rue	26 rue Brunel	
	Code postal et ville	75017 PARIS	
	Pays	FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)			
<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

Remplir impérativement la 2^{ème} page



BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 2/2

BR2

REMISE DES PIÈCES DATE 19 FEV 2003 LIEU 75-INPI-PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0302021 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI
DB 540 W / 210502		
6 MANDATAIRE (facultatif)		
Nom	TEZIER HERMAN	
Prénom	Béatrice	
Cabinet ou Société	BECKER ET ASSOCIES	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel	00-10000	
Adresse	Rue	35 rue des Mathurins
	Code postal et ville	75 10 10 18 PARIS
	Pays	FRANCE
N° de téléphone (facultatif)	01 53 43 85 00	
N° de télécopie (facultatif)	01 53 43 85 05	
Adresse électronique (facultatif)	becker@becker.fr	
7 INVENTEUR(S)		
Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques		
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes	<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		
Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)		
Établissement immédiat ou établissement différé	<input checked="" type="checkbox"/> Établissement immédiat <input type="checkbox"/> Établissement différé	
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)	Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		
Uniquement pour les personnes physiques		
<input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG		
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS		
<input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences		
Le support électronique de données est joint	<input checked="" type="checkbox"/>	
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe	<input checked="" type="checkbox"/>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) TEZIER HERMAN Béatrice CPI n°00-10000		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI

Méthodes et compositions pour le traitement
de pathologies dégénératives oculaires

La présente invention concerne le domaine de la biologie, de la génétique et de la médecine. Elle concerne notamment de nouvelles méthodes pour la
5 détection, la caractérisation et/ou le traitement (ou la prise en charge) de pathologies neurodégénératives. L'invention concerne également des méthodes pour l'identification ou le criblage de composés actifs dans ces pathologies. L'invention concerne également les composés, gènes, cellules, plasmides ou
10 compositions utiles pour la mise en œuvre des méthodes ci-dessus. L'invention découle notamment de l'identification du rôle de la phosphodiesterase 4B et du récepteur périphérique aux benzodiazépines dans les pathologies dégénératives et décrit leur utilisation comme cible ou marqueur thérapeutique, diagnostique ou expérimental de ces désordres.

15 De nombreuses pathologies neurodégénératives ont été décrites comme ayant une composante ou un stade lié au phénomène d'apoptose ou mort cellulaire programmée. On peut citer aussi bien les pathologies neurodégénératives du système nerveux central (par exemple l'ALS, la maladie de Parkinson ou la
20 maladie d'Alzheimer), que les maladies dégénératives périphériques, notamment oculaires. Ces pathologies disposent actuellement de traitements symptomatiques, notamment de traitement des phénomènes inflammatoires associés, mais pas de traitement des causes réelles de ces désordres, en raison notamment de la complexité des mécanismes et voies métaboliques
25 impliqués, et de la diversité des facteurs causatifs.

La demande de brevet internationale n° PCT/FR02/02861 déposée par la demanderesse décrit de nouvelles cibles moléculaires de la neurotoxicité, ainsi que de nouvelles approches thérapeutiques pour le traitement des pathologies
30 neurodégénératives. Ces approches sont basées sur une modulation de l'activité ou de l'expression d'une phosphodiesterase de type 4.

La présente demande concerne maintenant de nouvelles stratégies thérapeutiques de maladies dégénératives oculaires. Ces stratégies sont basées sur une modulation d'une ou plusieurs voies métaboliques identifiées par les inventeurs, qui sont corrélées à l'apparition, au développement et à la progression de l'excitotoxicité et de l'apoptose dans les cellules nerveuses, et sont particulièrement pertinentes dans les maladies neurodégénératives oculaires.

Plus particulièrement, un répertoire des altérations d'épissages dans le cerveau d'animaux modèles de l'ALS âgés de 60 jours a été effectuée par criblage différentiel qualitatif selon la technique DATAS (décrite dans la demande n° WO99/46403). Ce répertoire a été construit à partir d'ARN extraits d'échantillons de cerveau et de moelle épinière, sans isolement préalable des neurones, afin de prendre en compte un maximum d'événements d'épissages alternatifs liés au développement de la pathologie. Le répertoire ainsi produit contient plus de 200 séquences distinctes, impliquant des acteurs clefs du phénomène d'excitotoxicité tels que les canaux potassiques et le récepteur NMDA. La spécificité des séquences qui constituent ce répertoire est attestée par le fait que la même analyse différentielle qualitative de l'expression génétique réalisée sur des animaux âgés de 90 jours aboutit à un répertoire différent dont sont absents notamment les différents marqueurs de l'excitotoxicité. L'analyse des modifications d'épissage confirme que les événements moléculaires sont différents selon le stade de la pathologie.

De manière particulièrement intéressante et inattendue, la réalisation de DATAS sur des ARN d'animaux contrôles et transgéniques âgés de 60 jours a permis d'isoler des fragments d'ADNc dérivés de l'ARNm de la phosphodiesterase 4B et de PRAX-1. La présente demande démontre ainsi l'implication de la phosphodiesterase 4B et de PRAX-1 dans le développement des processus d'excitotoxicité et de mort neuronale.

Les résultats obtenus montrent plus précisément une expression plus prononcée de PDE4B dans les tissus nerveux pathologiques, liée à une modification structurale de l'ARN correspondant, notamment à la délétion d'une région dans la partie 3' non-codante. Ce résultat est tout à fait compatible avec la présence de séquences de déstabilisation des ARNm dans la séquence identifiée par DATAS. Leur délétion de l'ARNm de la PDE4B, par épissage ou par utilisation de séquences de polyadénylation alternatives, peut aboutir à une stabilisation, donc à une augmentation de l'expression de la partie codante de cet ARN. Cet événement se produit spécifiquement dans le cerveau des sujets pathologiques et non dans les sujets contrôles.

L'identification d'un fragment dérivé de PRAX-1 (ou *PBR-IP* pour « *peripheral benzodiazepine receptor interacting protein* ») démontre par ailleurs l'implication de cette protéine dans le développement des processus d'excitotoxicité et de mort neuronale. Prax-1 interagit avec le récepteur périphérique aux benzodiazépines (PBR), qui participe à la régulation de l'ouverture du pore mitochondrial de transition, ouverture qui caractérise l'exécution de l'apoptose. Par conséquent l'invention suggère que Prax-1 régule l'implication du PBR dans les phénomènes de morts cellulaires tels la mort neuronale.

20

La présente invention décrit donc deux événements moléculaires originaux qui aboutissent à une altération de l'expression de l'ARNm de la Prax-1 et de la PDE4 dans le cerveau de sujets pathologiques, et qui sont corrélés dans le temps avec le phénomène d'excitotoxicité et/ou de mort neuronale. Ces voies de signalisation, notamment celle représentée par Prax-1 et le PBR, constituent une cible thérapeutique nouvelle et importante dans le développement de thérapeutiques des pathologies neurodégénératives, utilisables notamment à des phases précoces de leur développement, et s'adressant aux véritables bases moléculaires de la pathologie et non aux symptômes ou composantes inflammatoires associées.

30

La possibilité d'affecter l'une ou, de préférence, simultanément ces deux voies métaboliques conduirait ainsi à des traitements particulièrement efficaces des pathologies neurodégénératives, notamment des maladies dégénératives oculaires.

5

Un premier aspect de l'invention concerne donc l'utilisation d'un ligand du PBR pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des pathologies neurodégénératives, notamment des pathologies dégénératives oculaires.

10

Un autre aspect de l'invention réside dans l'utilisation d'un composé inhibiteur de la PDE4 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des maladies dégénératives oculaires.

15 De manière préférée, le composé inhibiteur de la PDE4 est en outre un ligand d'un récepteur périphérique aux benzodiazépines. De tels composés permettent en effet d'agir avantageusement sur deux voies métaboliques impliquées dans les maladies dégénératives. Le composé est avantageusement choisi parmi les composés de la famille des pyrazolopyridines. Un composé particulièrement
20 préféré est l'étazolate.

Dans un autre mode de mise en œuvre, on utilise, en combinaison, deux composés, l'un étant un inhibiteur de la PDE4 et l'autre un ligand d'un récepteur
25 périphérique aux benzodiazépines. L'utilisation combinée peut être simultanée, séparée ou espacée dans le temps.

Dans un autre mode de réalisation, le composé est un acide nucléique anti-sens capable d'inhiber la transcription du gène de la PDE4B ou de PRAX-1, ou la traduction du messenger correspondant.

30

L'invention est particulièrement adaptée au traitement des dégénérescences de la rétine et notamment au traitement de la rétinite pigmentaire, de la dégénérescence maculaire, du glaucome ou des rétinopathies.

5 L'invention permet également le développement de tests, kits ou procédés de détection, dépistage ou diagnostic in vitro de ces pathologies, basés sur une détermination de la présence d'une dérégulation ou d'une altération dans un gène, un messenger ou une protéine PDE4 ou PRAX-1, chez un sujet. L'invention fournit également des outils pour la mise en œuvre de tels tests,
10 notamment des sondes, amorces, cellules, réactifs, etc.

L'invention fournit également des tests ou procédés pour cribler des molécules candidates pour le traitement des maladies dégénératives, comprenant la détermination de la capacité des molécules à lier le récepteur PBR, Prax-1 et/ou
15 PDE4.

Un autre objet de l'invention concerne une composition pharmaceutique comprenant un composé de la famille des pyrazolopyridines et un excipient acceptable sur le plan pharmaceutique et adapté à une administration intra-
20 oculaire. De préférence, le composé est tel que défini ci-après, notamment l'étazolate. La composition est typiquement sous forme d'un collyre, gel, gouttes, etc.

Thérapie

25 La présente invention concerne donc, de manière générale, l'utilisation d'inhibiteurs de PDE4 et/ou de ligands de PBR pour le traitement de maladies dégénératives oculaires.

30 L'utilisation d'inhibiteurs de PDE et avantageusement de PDE4 n'a jamais été envisagée pour améliorer la viabilité neuronale périphérique et plus particulièrement leur protection contre l'excitotoxicité. Les inhibiteurs de PDE4,

développés pour inhiber les phénomènes inflammatoires, ont été suggérés comme potentiellement utiles dans des pathologies neurodégénératives centrales comme la maladie d'Alzheimer. Cette suggestion s'appuie sur la volonté de réduire les inflammations qui sont observées dans le cerveau au cours des processus neurodégénératifs et nullement sur un rationnel visant à inhiber directement la mort neuronale. En outre, cette suggestion ne concerne nullement les maladies périphériques, notamment oculaires.

La présente invention montre l'existence d'événements d'épissage ou de sites de polyadénylation alternatifs affectant les gènes de la PDE4 et de Prax-1, associés au développement de l'excitotoxicité neuronale, et fournit la base moléculaire qui justifie l'utilisation d'inhibiteurs de PDE4 et/ou de ligands du PBR pour le traitement des maladies dégénératives oculaires et plus généralement pour améliorer la viabilité neuronale lors des phénomènes d'excitotoxicité, en particulier dès les phases précoces de ces pathologies.

Un objet de l'invention réside donc dans l'utilisation d'un composé inhibiteur de la PDE4 et/ou d'un ligand de PBR pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des maladies dégénératives oculaires.

De manière préférée, le composé inhibiteur de la PDE4 est en outre un ligand d'un récepteur périphérique aux benzodiazépines. De tels composés permettent en effet d'agir avantageusement sur deux voies métaboliques impliquées dans les maladies dégénératives.

Dans un autre mode de mise en œuvre, on utilise, en combinaison, deux composés, l'un étant un inhibiteur de la PDE4 et l'autre un ligand d'un récepteur périphérique aux benzodiazépines. L'utilisation combinée peut être simultanée, séparée ou espacée dans le temps.

Un autre objet de l'invention réside dans une méthode de traitement d'une pathologie dégénérative oculaire, comprenant l'administration à un sujet d'un

composé inhibiteur de PDE4 et/ou ligand d'un PBR, de préférence un composé inhibiteur de PDE4 et ligand d'un PBR.

5 Un autre objet de l'invention réside dans une méthode pour augmenter la survie des neurones chez des patients atteints de maladie dégénérative oculaire, comprenant l'administration à un sujet d'un composé tel que défini ci-avant.

10 Un autre objet de l'invention réside dans l'utilisation d'un composé tel que défini ci-avant pour inhiber ou réduire l'excitotoxicité neuronale lors des maladies dégénératives oculaires.

15 Un autre aspect de l'invention concerne l'utilisation d'au moins un composé inhibiteur de PDE4 appartenant à la famille des pyrazolopyridines, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à augmenter la survie neuronale chez les patients atteints de maladies dégénératives oculaires.

20 Dans le contexte de l'invention, le terme « traitement » désigne le traitement préventif, curatif, palliatif, ainsi que la prise en charge des patients (réduction de la souffrance, amélioration de la durée de vie, ralentissement de la progression de la maladie, amélioration de la survie des neurones, protection des neurones contre l'excitotoxicité ou l'apoptose, etc.), etc. Le traitement peut en outre être réalisé en combinaison avec d'autres agents ou traitements, notamment adressant les événements tardifs de la pathologie, tels que des inhibiteurs de

25

Le terme composé inhibiteur de PDE4 désigne tout composé capable d'inhiber l'expression ou l'activité de la PDE4, notamment la PDE4B, c'est-à-dire en particulier tout composé inhibant la transcription du gène, la maturation des ARNs, la traduction de l'ARNm, la modification post-traductionnelle de la protéine, l'activité enzymatique de la protéine, son interaction avec un substrat, etc. Il peut s'agir d'un composé inhibant la modification de l'ARN, notamment la

30

délétion d'une partie de la région 3' non-codante.

Dans un mode de réalisation particulier, le composé est un acide nucléique anti-sens, capable d'inhiber la transcription du gène de la PDE4B ou de PRAX-1, ou la traduction du messenger correspondant. L'acide nucléique anti-sens peut
5 comprendre tout ou partie de la séquence du gène de la PDE4B ou de PRAX-1, d'un fragment de celle-ci, du messenger de la PDE4B ou de PRAX-1, ou d'une séquence complémentaire à celles-ci. L'antisens peut notamment comprendre une région complémentaire de la séquence comprise entre les résidus 218-2383 de SEQ ID NO :1 ou 766-2460 de SEQ ID NO :3, et inhiber (ou réduire) sa
10 traduction en protéine. L'antisens peut être un ADN, un ARN, un ribozyme, etc. Il peut être simple-brin ou double-brin. Il peut également s'agir d'un ARN codé par un gène antisens. S'agissant d'un oligonucléotide antisens, il comprend typiquement moins de 100 bases, par exemple de l'ordre de 10 à 50 bases. Cet oligonucléotide peut être modifié pour améliorer sa stabilité, sa résistance aux
15 nucléases, sa pénétration cellulaire, etc.

Selon un autre mode de réalisation, le composé est un peptide, par exemple comprenant une région de la protéine PDE4 (notamment PDE4B) et capable d'antagoniser son activité.

20

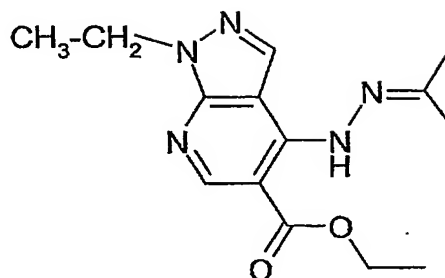
Selon un autre mode de réalisation, le composé est un composé chimique, d'origine naturelle ou synthétique, notamment une molécule organique ou inorganique, d'origine végétale, bactérienne, virale, animale, eucaryote, synthétique ou semi-synthétique, capable de moduler l'expression ou l'activité
25 de la PDE4B, et/ou de lier un récepteur PBR.

Dans une variante préférée, on utilise un composé de la famille des pyrazolopyridines, parmi lesquels figure notamment l'étazolate. Ceux-ci sont en effet capables de lier le PBR et d'inhiber les PDE4.

30

Les composés de la famille des pyrazolopyridines sont en particulier choisis parmi les composés suivants :

- L'étazolate de formule suivante :



l'étazolate constituant un mode de mise en œuvre préféré de l'invention,

- Ester éthylique de l'acide 4-butylamino-1-ethyl-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique (tracazolate),
- Ester éthylique de l'acide 4-butylamino-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 1-(4-amino-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-1-yl)-β-*D*-1-deoxy-ribofuranose
- Ester éthylique de l'acide 1-ethyl-4-(*N'*-isopropylidene-hydrazino)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique (SQ 20009),
- 4-amino-6-méthyl-1-*n*-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine
- Ester éthylique de l'acide 4-Amino-1-ethyl-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique (desbutyl tracacolate),
- 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxamide,
- Ester éthylique de l'acide 1-ethyl-6-méthyl-4-méthylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- Ester éthylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-propyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- Ester éthylique de l'acide 1-ethyl-4-éthylamino-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- Ester éthylique de l'acide 4-amino-1-butyl-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 5-(4-amino-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-1-yl)-2-hydroxyméthyl-tetrahydro-furan-3-ol,

- ester allylique de l'acide 1-allyl-4-amino-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- acide 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester éthylique de l'acide 4-amino-1-éthyl-3,6-diméthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester éthylique de l'acide 4-diméthylamino-1-éthyl-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester éthylique de l'acide 1-éthyl-6-méthyl-4-propylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester éthylique de l'acide 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester éthylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pent-4-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 4-amino-1-but-3-enyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-allylamide,
- 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-isopropylamide,
- 4-amino-1-pentyl-*N*-*n*-propyl-1*H*-pyrazolo-[3,4-*b*]pyridine-5-carboxamide,
- ester allylique de l'acide 4-amino-1-butyl-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester éthylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-prop-2-ynylamide
- ester allylique de l'acide 4-amino-1-(3-méthyl-butyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo<3,4-*b*>pyridine-5-*N*-(2-propenyl)carboxamide,
- ester allylique de l'acide 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-butylamide,
- ester allylique de l'acide 4-amino-1-but-3-ynyl-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

- ester allylique de l'acide 4-amino-1-but-3-enyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-allylamide,
- 5 - ester allylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester allylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-(3-methyl-butyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 10 - ester isobutylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 15 - 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-butylamide,
- ester allylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-(3-methyl-but-2-enyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 20 - 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-cyclopropylamide,
- ethyl 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-hydroxamate,
- ester prop-2-ynylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 25 - ester allylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pent-4-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 30 - ester allylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pent-4-enyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 4-amino-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-propylamide,
- 35 - 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-cyclopropylmethyl-amide,
- ester 2-méthyl-allylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 40 - 4-Amino-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-allylamide (ICI 190,622),
- 4-amino-1-pent-4-ynyl-N-2-propenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxamide,
- 45 - 4-amino-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-prop-2-ynylamide,
- 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-but-2-ynylamide,

- ester allylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester allylique de l'acide 4-amino-1-(2-cyclopropyl-éthyl)-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

- ester allylique de l'acide 4-amino-1-hex-5-ynyl-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 10 - 4-amino-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-cyclopropylméthyl-amide,
- ester but-3-énylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 15 - ester cyclopropylméthylque de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 4-butylamino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-allylamide,
- 20 - ester 2-cyclopropyl-éthylque de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester cyclopropylméthylque de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 25 - ester cyclopropylméthylque de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pent-4-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester éthylique de l'acide 4-amino-1-benzyl-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 30 - 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-benzylamide,
- 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-phenylamide,
- 35 - ester benzylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 4-Azido-1-β-D-ribofuranosylpyrazolo[3,4-*b*]pyridine,
- 40 - 1-pent-3-ynyl-N-2-propenyl-4-propionamido-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxamide,
- 2-(4-amino-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-1-yl)-5-hydroxyméthyl-tetrahydro-furan-3,4-diol,
- 45 - 2-(6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-ethanol,

- 3-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-propan-1-ol,
- ester propylique de l'acide 3-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-acétique,
- 5 - ester éthylique de l'acide 2-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-propionique,
- ester éthylique de l'acide 2-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-pentanoïque,
- 10 - ester éthylique de l'acide 2-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-benzoïque,
- 15 - ester propylique de l'acide 3-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-pentanoïque,
- *N*-benzylidene-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,
- 20 - *N*-furan-2-ylmethylene-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,
- *N*-(4-fluoro-benzylidene)-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,
- 25 - *N*-(3-furan-2-yl-allylidene)-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,
- *N*-(4-methoxy-benzylidene)-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,
- 30 - 4-[(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazonomethyl]-benzonitrile,
- 35 - *N*-benzo[1,3]dioxol-5-ylmethylene-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,
- *N*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(4-nitro-benzylidene)-hydrazine,
- 40 - *N*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(2-nitro-benzylidene)-hydrazine,
- *N*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(4-trifluoromethyl-benzylidene)-hydrazine,
- 45 - *N*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(5-nitro-furan-2-ylmethylene)-hydrazine,

- *N*-(3-méthyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(2-trifluorométhyl-benzylidène)-hydrazine,

5 - *N*-(3-méthyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(6-nitro-benzo[1,3]dioxol-5-ylméthylène)-hydrazine,

- Acide 4-(3-chloro-4-méthoxy-benzylamino)-1-éthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

10

- 4-(3-chloro-4-méthoxy-benzylamino)-1-éthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-(pyridin-4-ylméthyl)-amide,

15

- 4-(3-chloro-4-méthoxy-benzylamino)-1-éthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-(tetrahydro-furan-2-ylméthyl)-amide,

- 4-(3-chloro-4-méthoxy-benzylamino)-1-éthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-(5-hydroxy-pentyl)-amide,

20

- 4-(3-chloro-4-méthoxy-benzylamino)-1-éthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-[3-(2-oxo-pyrrolidin-1-yl)-propyl]-amide,

25

- ester éthylique de l'acide 4-*tert*-butylamino-1-(2-chloro-2-phenyl-éthyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

- ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-éthyl)-4-cyclopropylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

30

- ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-éthyl)-4-propylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

- ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-éthyl)-4-phenylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

35

- ester éthylique de l'acide 4-butylamino-1-(2-chloro-2-phenyl-éthyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

40

- ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-éthyl)-4-(2-éthoxy-éthylamino)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

- ester éthylique de l'acide 4-benzylamino-1-(2-chloro-2-phenyl-éthyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

45

- ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-éthyl)-4-phenéthylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique.

L'invention révèle que ces composés présentent l'intérêt inégalé de pouvoir interférer avec deux événements moléculaires impliqués dans la régulation de la vie cellulaire. Ils maintiennent d'une part la concentration d'AMPc intracellulaire à un niveau qui prévient l'activation des cascades apoptotiques de mort cellulaire, et d'autre part interfèrent avec l'exécution proprement dite de l'apoptose en inhibant l'ouverture du pore de transition mitochondrial.

Une autre propriété de ces composés est d'inhiber préférentiellement, parmi les phosphodiésterases, les phosphodiésterases cAMP dépendantes, c'est-à-dire qui hydrolysent le cAMP intracellulaire. Par conséquent, ces composés n'affectent pas la concentration de cGMP. Augmenter la concentration est avantageux lorsqu'on veut maintenir la viabilité de neurones tels que les motoneurones. En revanche, les cellules de la rétine, comme les bâtonnets, souffrent d'un excès de cGMP, l'augmentation de cAMP étant moins critique.

Par conséquent, les pyrazolopyridines sont particulièrement adaptées au traitement des dégénérescence de la rétine, qui sont les caractéristiques de la rétinite pigmentaire, de la dégénérescence maculaire, notamment liée à l'âge, du glaucome et des rétinopathies, notamment diabétiques.

La présente invention propose donc, pour la première fois, la PDE4 et PBR comme cibles thérapeutiques, de préférence combinées, pour le traitement des événements moléculaires associés à l'excitotoxicité, notamment dans les maladies dégénératives oculaires. Selon des modes de mise en œuvre particuliers, l'invention peut être utilisée pour inhiber ou réduire l'excitotoxicité neuronale en phase précoce de ces maladies. Elle est applicable notamment au traitement du glaucome, de la dégénérescence maculaire, des rétinopathies et de la rétinite pigmentaire.

Les composés peuvent être formulés et administrés de différentes façons.

L'administration peut être réalisée par toute méthode connue de l'homme du métier, de préférence par voie orale ou par injection, systémique ou locale. L'injection est typiquement réalisée par voie intra-oculaire, intra-péritonéale,

intra-cérébrale, intra-veineuse, intra-artérielle ou intra-musculaire. L'administration par voie orale, systémique ou intra-oculaire est préférée. Les doses administrées peuvent être adaptées par l'homme de l'art. Typiquement, de 0,01 mg à 100 mg /kg environ sont injectés, pour des composés inhibiteurs

5 de nature chimique. Il est entendu que des injections répétées peuvent être réalisées, éventuellement en combinaison avec d'autres agents actifs ou tout véhicule acceptable sur le plan pharmaceutique (ex., tampons, solutions saline, isotonique, en présence d'agents stabilisants, etc.).

10 L'invention est utilisable chez les mammifères, notamment chez l'être humain. Les résultats présentés dans les exemples illustrent l'efficacité d'inhibiteurs de PDE4B pour améliorer la viabilité de neurones placés en conditions d'excitotoxicité.

15 Détection, Diagnostic et dépistage

Un autre objet de l'invention réside dans une méthode de détection d'une situation d'excitotoxicité ou de stress neuronal chez un sujet, comprenant la mesure in vitro de l'expression de Prax-1 et/ou de la PDE4 dans un échantillon
20 provenant du sujet. La méthode comprend avantageusement une mesure de l'expression différentielle de la région 3' non-codante du gène PDE4B et du reste du gène, notamment de la partie codante.

Un autre objet de l'invention réside donc dans une méthode de détection d'une situation d'excitotoxicité ou de stress neuronal chez un sujet, comprenant la
25 détection de la présence d'une forme mutée de l'ARN de Prax-1 et/ou de la phosphodiesterase 4, notamment de la phosphodiesterase 4B dans un échantillon provenant du sujet, en particulier d'une forme délétée de tout ou partie de la région 3' non-codante.

30

Un autre objet de l'invention réside dans l'utilisation d'un acide nucléique comprenant tout ou partie d'une séquence dérivée du gène ou de l'ARN

messenger de Prax-1 ou de la PDE4B pour la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic ou de détection d'une situation de stress neuronal et plus particulièrement la situation d'excitotoxicité.

5 L'invention réside, généralement, dans l'utilisation d'un acide nucléique complémentaire de tout ou partie du gène ou du messenger de Prax-1 et/ou de la PDE4B, pour la détection d'événements pathologiques de type excitotoxicité, stress ou mort neuronale, etc. Plus généralement, l'invention repose sur une méthode de diagnostic, dépistage, caractérisation ou suivi d'une pathologie
10 dégénérative oculaire, comprenant la mise en évidence d'une altération dans le gène PDE4 et/ou Prax-1, ou dans l'ARN correspondant.

L'expression de PRAX-1 et/ou de la PDE4, ou le différentiel d'expression, ou la présence d'une forme altérée peuvent être déterminés par des techniques
15 conventionnelles de biologie moléculaire, comme par exemple par séquençage, hybridation, amplification, RT-PCR, migration sur gel, etc. L'invention est applicable au diagnostic ou la détection de différentes pathologies impliquant les phénomènes d'excitotoxicité, telles que les maladies dégénératives oculaires (rétinopathies, glaucome, dégénérescence maculaire, etc.). Elle peut être
20 utilisée pour la détection précoce, la mise en évidence d'une prédisposition, le choix et l'adaptation d'un traitement, le suivi de l'évolution de la pathologie, etc.

Pour la mise en œuvre des méthodes génétiques de diagnostic ou de détection selon l'invention, on utilise plus particulièrement des acides nucléiques capables
25 de mettre en évidence une forme délétée de l'ARNm de Prax-1 ou de la la PDE4B, notamment une forme dépourvue de tout ou partie de la région 3' non codante de la PDE4B. A titre d'exemple spécifique, on utilise un acide nucléique complémentaire de tout ou partie de la région comprise entre les résidus 2760 à 2869 de la séquence SEQ ID NO :1, ou des résidus correspondants de la
30 séquence du gène ou de l'ARNm de la PDE4B humaine. La séquence de l'ADNc codant la PDE4B humaine et de la protéine correspondante sont représentées dans les séquences SEQ ID NO : 3 et 4 (voir également Genbank,

n° NM_002600). La région 3' non-codante de l'ARN ou du gène PDE4B humain correspond aux résidus 2461 à 4068 de SEQ ID NO :3.

- Avantageusement, l'acide nucléique utilisé (comme sonde) comprend tout ou
- 5 partie de la séquence codant la région 3' non-codante du gène ou de l'ARN de la PDE4B comprise entre les nucléotides 2384 et 2869 de la séquence SEQ ID NO :1 ou entre les nucléotides 2461 et 4068 de la séquence SEQ ID NO :3 ou une séquence complémentaire de celles-ci.
- 10 Selon des modes particuliers de mise en œuvre, l'invention utilise un acide nucléique complémentaire d'une région comprise dans une séquence suivante :
- résidus 2384 à 2869 de SEQ ID n° 1
 - résidus 2500 à 2869 de SEQ ID n° 1
 - résidus 2760 à 2869 de SEQ ID n° 1

15 - résidus 2780 à 2850 de SEQ ID n° 1

 - résidus 2790 à 2810 de SEQ ID n° 1
 - résidus 2600 à 4040 de SEQ ID n° 3
 - résidus 3000 à 4040 de SEQ ID n° 3
 - résidus 3500 à 4040 de SEQ ID n° 3

20 - résidus 3900 à 4040 de SEQ ID n° 3.

Selon un autre mode particulier, on utilise un acide nucléique complémentaire de la séquence de la région de l'ARN de PDE4 résultant de la délétion de tout ou partie de la partie 3' non codante. L'élimination d'un domaine crée en effet de

25 nouvelles jonctions dans la séquence, qui sont spécifiques de la forme délétée et peuvent être utilisées pour mettre en évidence la présence d'une telle forme dans un échantillon.

La complémentarité entre la sonde et la séquence cible est, de préférence,

30 parfaite pour assurer une meilleure spécificité d'hybridation. Toutefois, il est entendu que certains mésappariements peuvent être tolérés. L'acide nucléique utilisé pour la mise en œuvre des méthodes ci-dessus peut être un ADN ou un

ARN, de préférence un ADN d'origine synthétique. Il comporte de préférence de 10 à 500 bases, typiquement de 10 à 100 bases. Il est entendu qu'un acide nucléique plus long peut être utilisé, si désiré, bien que cela ne soit pas préféré. L'acide nucléique est avantageusement un ADN simple brin, de 10 à 500 bases, complémentaire d'une région au moins de la séquence 3'-non codante de la PDE4B. L'acide nucléique peut être marqué, par exemple par voie radioactive, enzymatique, luminescente, fluorescente, chimique, etc.

Une autre approche pour détecter la présence d'une altération du gène PRAX-1 ou PDE4 utilise une amorce ou un couple d'amorces nucléiques permettant une amplification sélective d'une portion de l'ARN PRAX-1 ou PDE4, de préférence comprenant une portion de la région 3' non codante de PDE4 ou codante de PRAX-1. On utilise typiquement une amorce permettant l'amplification sélective de la forme altérée de l'ARN de PRAX-1 ou de PDE4, notamment d'une amorce spécifique de la jonction créée par l'élimination d'une partie de l'ARN par épissage.

A cet égard, un objet de l'invention réside dans une amorce complémentaire d'une partie de l'ARN de PRAX-1, et permettant l'amplification d'une partie de cet ARN. L'amorce comporte avantageusement de 8 à 20 bases. Elle est préférentiellement composée d'un fragment de 8 à 20 résidus consécutifs de la séquence donnée dans Genbank sous le n°AF039571, plus préférentiellement d'une partie au moins de la région couverte par les nucléotides 791 à 820 de cette séquence. Un autre objet de l'invention réside dans un couple d'amorce permettant l'amplification spécifique d'une partie au moins de l'ARN de Prax-1, le dit couple comprenant au moins une amorce telle que définie ci-dessus.

Pour la mise en œuvre des méthodes selon l'invention, on met en contact in vitro un échantillon biologique d'un sujet, contenant un acide nucléique, avec un acide nucléique (sonde, amorce, etc.) tel que défini ci-dessus, et on détecte la formation d'un hybride ou d'un produit d'amplification. L'échantillon biologique

peut être un échantillon de sang, de fluide, de cellule, de tissu, etc. L'acide nucléique peut être immobilisé sur un support, de type verre, silice, nylon, etc.

~~Le procédé de détection, dépistage ou diagnostic peut être mis en œuvre à~~
5 partir de différents types d'échantillons provenant d'un sujet, comme par exemple des biopsies de tissus, notamment de tissu nerveux. De manière particulièrement surprenante et avantageuse, la présente invention montre par ailleurs que la dérégulation de l'expression de PDE4, corrélée au phénomène d'excitotoxicité, peut être mise en évidence directement dans le tissu
10 musculaire.

Un autre objet réside dans un kit pour l'analyse de l'expression de la PDE4, et/ou de Prax-1, le kit comprenant une sonde nucléotidique spécifique d'une partie de la séquence de l'ARNm de Prax-1 et/ou de la PDE4.
15

Un autre objet réside dans un kit pour l'analyse de l'expression de Prax-1, notamment de l'expression de formes altérées de Prax-1, le kit comprenant un couple d'amorces nucléotidiques permettant l'amplification spécifique d'une partie au moins d'une région de l'ARNm d'un isoforme spécifique de Prax-1.
20

Méthodes de sélection et outils

D'autres objets de l'invention concernent des méthodes de sélection, identification ou caractérisation de composés actifs sur les pathologies
25 associées à l'excitotoxicité, ou au stress neuronal, notamment sur les pathologies dégénératives oculaires, comprenant la mise en contact de composés tests avec une cellule exprimant Prax-1 et/ou la PDE4B (notamment un variant dépourvu de domaine 3' non-codant), et la mise en évidence des composés inhibant l'expression ou l'activité de cette protéine.
30

Les méthodes peuvent être mises en œuvre avec différentes populations cellulaires, telles que des cellules primaires ou des lignées de cellules d'origine

mammifère (humaine, murine, etc.). On utilise avantageusement des cellules qui n'expriment pas naturellement Prax-1 ou la PDE4B, transfectées avec un acide nucléique codant le variant souhaité. De cette manière, la sélectivité de la méthode est augmentée. On peut également utiliser des cellules eucaryotes inférieures (levure, etc.) ou des cellules procaryotes.

Les méthodes de criblage peuvent également être réalisées en système acellulaire, par mesure de la capacité de composés tests à lier prax-1 et/ou la PDE4B ou un variant ou fragment de celles-ci.

Un autre objet de l'invention concerne tout acide nucléique codant un polypeptide tel que défini ci-dessus, les vecteurs le contenant, cellules recombinantes, et utilisations. Les vecteurs peuvent être des plasmides, phages, cosmides, virus, chromosomes artificiels, etc. Des vecteurs préférés sont par exemple des vecteurs plasmidiques, comme ceux dérivés de plasmides commerciaux (pUC, pcDNA, pBR, etc.). De tels vecteurs comportent avantageusement un gène de sélection et/ou une origine de réplication et/ou un promoteur transcriptionnel. D'autres vecteurs particuliers sont par exemples des virus ou des phages, notamment des virus recombinants défectifs pour la réplication, tels que des virus dérivés de rétrovirus, adénovirus, AAV, herpès-virus, baculovirus, etc. Les vecteurs peuvent être utilisés dans tout hôte compétent, comme par exemple des cellules procaryotes ou eucaryotes. Il peut s'agir de bactéries (par exemple *E. coli*), levures (par exemple *Saccharomyces* ou *Kluyveromyces*), cellules végétales, cellules d'insectes, cellules de mammifères, notamment humaines, etc. Il peut s'agir de lignées, cellules primaires, cultures mixtes, etc.

D'autres aspects et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

LEGENDE DES FIGURES

Figure 1: PCR semi-quantitative de PDE4B à partir d'échantillons de cerveau (1A) et de muscle (1B).

~~Figure 2: Effet neuroprotecteur de l'étazolate sur la toxicité induite par~~

5 NMDA/serine sur les cellules granulaires du cervelet.

Figure 3: Effet neuroprotecteur de l'étazolate sur la toxicité induite par le kainate sur les cellules granulaires du cervelet.

Figure 4: Effet neuroprotecteur de l'étazolate sur la toxicité induite par NMDA/serine sur les neurones corticaux.

10 Figure 5: Effet neuroprotecteur de l'étazolate sur la toxicité induite par le kainate sur les neurones corticaux.

EXEMPLES

15 Exemple 1 : Identification de la PDE4 et de PBR comme cibles moléculaires de l'excitotoxicité

L'analyse qualitative différentielle a été effectuée à partir d'ARN poly adénylés (poly A+) extraits d'échantillons de cerveaux d'animaux correspondant aux
20 différents stades, sans isolement préalable des neurones afin de prendre en compte un maximum d'évènements d'épissages alternatifs liés au développement de la pathologie.

Les ARN poly A+ sont préparés selon des techniques connues de l'homme de métier. Il peut s'agir en particulier d'un traitement au moyen d'agents
25 chaotropiques tels que le thiocyanate de guanidium suivi d'une extraction des ARN totaux au moyen de solvants (phénol, chloroforme par exemple). De telles méthodes sont bien connues de l'homme du métier (voir Maniatis et al., Chomczynski et al., Anal. Biochem. 162 (1987) 156), et peuvent être aisément
30 pratiquées en utilisant des kits disponibles dans le commerce. A partir de ces ARN totaux, les ARN poly A+ sont préparés selon des méthodes classiques connues de l'homme de métier et proposées par des kits commerciaux.

Ces ARN poly A+ servent de matrice à des réactions de transcription inverse à l'aide de reverse transcriptase. Avantageusement sont utilisées des reverse transcriptases dépourvues d'activité RNase H qui permettent d'obtenir des premiers brins d'ADN complémentaire de tailles supérieures à ceux obtenus avec des reverse transcriptases classiques. De telles préparations de reverse transcriptases sans activité RNase H sont disponibles commercialement.

Pour chaque point de la cinétique de développement de la pathologie (30 jours, 60 jours et 90 jours) les ARN poly A+ ainsi que les ADNc simple brins sont préparés à partir des animaux transgéniques (T) et des animaux contrôles syngéniques (C).

Conformément à la technique DATAS, pour chaque point de la cinétique sont réalisées des hybridations d'ARNm (C) avec des ADNc (T) et des hybridations réciproques d'ARNm (T) avec des ADNc (C).

Ces hétéroduplex ARNm/ADNc sont ensuite purifiés selon les protocoles de la technique DATAS.

Les séquences d'ARN non appariées avec un ADN complémentaire sont libérées de ces hétéroduplex sous l'action de la RNase H, cette enzyme dégradant les séquences d'ARN appariées. Ces séquences non appariées représentent les différences qualitatives qui existent entre des ARN par ailleurs

homologues entre eux. Ces différences qualitatives peuvent être localisées n'importe où sur la séquence des ARN, aussi bien en 5', 3' ou à l'intérieur de la séquence et notamment dans la séquence codante. Selon leur localisation, ces séquences peuvent être non seulement des modifications d'épissage mais également des conséquences de translocations ou de délétions.

Les séquences d'ARN représentant les différences qualitatives sont ensuite clonées selon les techniques connues de l'homme de métier et notamment celles décrites dans le brevet de la technique DATAS.

Ces séquences sont regroupées au sein de banques de cDNA qui constituent des banques qualitatives différentielles. Une de ces banques contient les exons et les introns spécifiques de la situation saine ; les autres banques contiennent les événements d'épissage caractéristiques des conditions pathologiques.

L'expression différentielle des clones a été vérifiée par hybridation avec des sondes obtenues par reverse-transcription à partir d'ARN messagers extraits des différentes situations étudiées. Les clones hybridant de façon différentielle ont été retenus pour analyse ultérieure. Les séquences identifiées par DATAS

5 correspondent à des introns et/ou à des exons exprimées de façon différentielle par épissage entre les situations pathologiques et la situation saine. Ces événements d'épissage peuvent être spécifiques d'une étape donnée du développement de la pathologie ou caractéristiques de l'état sain.

10 La comparaison de ces séquences avec les banques de données permet de classifier les informations obtenues et de proposer une sélection raisonnée des séquences selon leur intérêt diagnostique ou thérapeutique.

La réalisation de DATAS sur des ARN d'animaux contrôles et transgéniques
15 âgés de 60 jours a permis d'isoler un fragment d'ADNc dérivé de l'ARNm de la phosphodiesterase 4B. Ce fragment correspond à un fragment d'exon spécifiquement présent dans les animaux contrôles et donc spécifiquement délété dans les animaux transgéniques pour SOD1G93A au stade 60 jours. Ce
20 fragment recouvre les nucléotides 377 à 486 référencés à partir du codon stop de la PDE4B de souris (SEQ ID NO :1) (séquence également accessible dans GenBank, n°AF208023). Cette séquence comprend 2912 bases, le fragment délété correspondant aux bases 2760 à 2869. Cette région est non codante et est exprimée différemment entre les animaux contrôles et les animaux
25 transgéniques, du fait de l'utilisation alternative d'un exon 3' non codant ou du fait de l'utilisation de deux sites de polyadénylation alternatifs.

La réalisation de DATAS sur des ARN d'animaux contrôles et transgéniques âgés de 60 jours a également permis d'isoler un fragment d'ADNc dérivé de l'ARNm de PRAX-1 ou PBR-IP (peripheral benzodiazepine receptor interacting
30 protein). Ce fragment correspond à un fragment d'exon spécifiquement présent dans les animaux contrôles et donc spécifiquement délété dans les animaux transgéniques pour SOD1G93A au stade 60 jours. Ce fragment est homologue

aux nucléotides 791 à 820 de la séquence humaine référencée dans GenBank sous le n°AF039571. Cette région est codante et est exprimée différemment entre les animaux contrôles et les animaux transgéniques, du fait d'un épissage alternatif.

5

Exemple 2 : Expériences de RT-PCR : Confirmation de l'expression différentielle :

10 L'expression différentielle de la PDE4B dans une situation de stress neuronal, par rapport à une situation de référence, a été vérifiée par des expériences de RT PCR présentées sur la figure 1.

Ces expériences ont été réalisées selon des techniques bien connues de l'homme de métier et ont permis de suivre les expressions de deux régions distinctes de l'ARNm de la PDE4B. Une de ces régions recouvre le codon, 15 d'initiation de cet ARNm (PDE4B 5'), l'autre recouvre en partie le fragment identifié selon la technique DATAS (PDE4B DATAS). Les localisations des amorces de PCR utilisées sont indiquées sur la figure 1.

L'ARN PO correspond à un ARN ribosomal utilisé comme contrôle interne destiné à vérifier que la même quantité d'ARN est utilisée pour chaque point 20 expérimental. Les analyses ont été réalisées à partir d'ARN extraits d'animaux contrôles (C) et transgéniques (T) âgés de 30, 60 et 90 jours, c'est à dire avant l'apparition des symptômes pathologiques.

Les ARN totaux du cerveau des souris contrôle ou SOD1 G93A âgées 30, 60 et 90 jours sont transcrits en ADNc utilisant le protocole standard de Superscript™ 25 (Invitrogen). Pour les PCR semi-quantitatives les produits de la réaction de reverse transcription sont dilués 10 fois. Les amorces spécifiques du fragment DATAS correspondent pour le sens aux nucléotides 2526-2545 (5' GCC AGG CCG TGA AGC AAA TA 3' ; SEQ ID NO : 5), et pour l'anti-sens aux 2790-2807 (5' TCA AAG ACG CGA AAA CAT 3'; SEQ ID NO : 6) et pour le fragment plus 30 en 3 prime les amorces correspondent pour le sens aux nucléotides 145-165 (5' CCG CGT CAG TGC CTT TGC TAT 3'; SEQ ID NO : 7), et pour l'anti-sens aux 426-404 (5' CGC TGT CGG ATG CTT TTA TTC AC 3'; SEQ ID NO : 8). Comme

gène de référence le gène P0 est utilisé et amplifié par les amorces, sens : 5' TCG CTT TCT GGA GGG TGT C 3' (SEQ ID NO : 9) et anti-sens : CCG CAG GGG CAG CAG TGG 3' (SEQ ID NO : 10).

L'amplification est effectuée par 30 cycles de PCR suivants :

- 5 - 30 secondes à 94°C
- une minute à 57°C
- 30 secondes à 72°C, suivi par un cycle de 2 minutes à 72°C

Les différents produits de PCR sont mis sur un gel d'agarose de 1.5 %. L'expérience est répétée trois fois avec deux réactions de reverse transcription différentes.

La figure 1 présente les résultats obtenus à partir d'ARN extraits des cerveaux ou des muscles des animaux.

Alors que la même quantité d'ADNc est amplifiée à partir de l'ARN de P0 dans tous les échantillons, de variations sont observées pour l'ARNm de la PDE4B : les variations les plus significatives sont détectées chez les animaux âgés de 90 jours : alors qu'une augmentation du niveau d'expression du fragment PDE4 5' est observée dans le cerveau des animaux transgéniques, une très forte diminution de l'expression de PDE4B (DATAS) est observée dans le cerveau des animaux transgéniques.

Ce résultat établit une corrélation entre la diminution de l'expression d'un fragment 3' non codant de l'ARNm de la PDE4B et l'augmentation de l'expression de la partie 5' codante de ce même messenger. Ce résultat est tout à fait compatible avec la présence de séquences de déstabilisation des ARNm dans la séquence identifiée par DATAS et démontre la corrélation entre l'expression de PDE4B et le phénomène d'excitotoxicité.

Exemple 3 : Inhibition de l'excitotoxicité par des ligands de PBR inhibiteurs de PDE4

Pour cet exemple, des neurones granulaires du cervelet de rat ainsi que des neurones corticaux ont été mis en culture selon les techniques connues de l'homme de métier.

5 Culture primaire des cellules granulaires de cervelet :

Les rats Wistar âgés de sept jours sont décapités et leurs cervelets sont disséqués. Après avoir enlevé les méninges, le tissu est coupé en petits morceaux et trypsinisé pendant 15 minutes à 37°C. Les cellules sont dissociées par trituration et mises en cultures à une densité 300.000 cellules par cm² dans
10 du milieu basal Eagle supplémenté avec 10% du sérum de veau foetal et 2 mM glutamine. Le lendemain 10 µM ARA-C, un anti-mitotique, est ajouté pour empêcher la prolifération des cellules gliales. Les cellules sont traitées le jour 9 de cultures avec le composé inhibiteur étazolate, trois heures avant l'addition des toxiques, 50 µM kainate ou 100 µM N-méthyl-D-aspartate en présence de
15 10 µM D-sérine. Le 8-bromo-cAMP est ajouté juste avant les toxiques. Tous les traitements sont effectués au minimum en double et dans au moins deux cultures différentes. Après une incubation de six heures la toxicité est mesurée par un test MTT. Les résultats, normalisés à la moyenne du non-traité, sont statistiquement analysés par le test de Wilcoxon. La valeur significative est
20 déterminée à p inférieur ou égal à 0.05.

Cultures primaires des cellules corticales :

Des embryons de rat Wistar, âgés de 16 jours, sont prélevés et les cortex sont disséqués. Après la trypsination à 37°C pendant 25 minutes, les cellules sont
25 dissociées par trituration. Les cellules sontensemencées dans du milieu essentiel minimum, supplémenté avec 10% de sérum de cheval et 10% de sérum de veau foetal et 2 mM glutamine, à une densité de 300.000 cellules par cm². Après 4 jours en culture la moitié du milieu est changée avec du milieu essentiel minimum supplémenté avec 5% de sérum de cheval et 2 mM
30 glutamine. Le même jour, 10 µM de 5-fluoro-2-deoxyuridine, un anti-mitotique, est ajouté. Après sept et onze jours de culture, la moitié du milieu est changée par du milieu conditionné. Le milieu conditionné est composé de MEM

contenant 5 % de sérum de cheval et 2 mM glutamine ; ce milieu est passé sur un tapis d'astrocytes corticales pendant une nuit avant son utilisation. A jour 14, les cellules sont traitées avec le composé inhibiteur étazolate, une heure avant

l'addition des toxiques, 50 μ M kainate ou 20 μ M N-méthyl-D-aspartate en

5 présence de 10 μ M D-sérine. Tous les traitements sont effectués au minimum en double et dans au moins deux cultures différentes. Après une incubation de six heures la toxicité est mesurée par un test MTT. Les résultats, normalisés à la moyenne du non-traité, sont statistiquement analysés par le test de Wilcoxon. La valeur significative est déterminée à p inférieur ou égal à 0.05.

MTT:

La toxicité est mesurée en utilisant le test MTT. Après l'incubation avec les composés, du MTT est ajouté à une concentration finale de 0.5 mg/ml par puits. Les plaques sont ensuite incubées pendant 30 minutes à 37 °C dans le noir. Le milieu est aspiré et les cristaux sont resuspendus dans 500 μ l de DMSO (dimethylsulfoxyde). L'absorbance à 550 nm est lue et le pourcentage de viabilité est calculé.

Résultats :

Les résultats obtenus sont présentés sur les figures 2-5. Ces résultats illustrent l'effet protecteur des composés de l'invention sur la survie neuronale. Lors du co-traitement des neurones par un inhibiteur de l'invention, un effet protecteur dose-dépendent est observé dans les deux modes d'induction de l'excitotoxicité (NMDA/Sérine et kainate).

Les figures 2 et 3 présentent des résultats obtenus à l'aide de l'étazolate sur les cellules granulaires du cervelet. Les résultats présentés montrent que l'étazolate permet d'atteindre sur ces cellules un effet protecteur de 60% dans le cas du traitement NMDA/Ser, et de 57% dans le cas de la toxicité induite par le kainate.

Les figures 4 et 5 présentent des résultats obtenus à l'aide de l'étazolate sur les neurones corticaux. Les résultats présentés montrent que l'étazolate permet d'atteindre sur ces cellules un effet protecteur de 33% dans le cas du traitement NMDA/Ser, et de 25% dans le cas de la toxicité induite par le kainate.

5

La présente invention documente donc non seulement l'implication de la PDE4B et de PBR dans les mécanismes d'excitotoxicité, mais également la capacité d'inhibiteurs à préserver la viabilité neuronale lors de stress liés à l'excitotoxicité.

REVENDECATIONS

1. Utilisation d'un composé inhibiteur de la PDE4 pour la préparation d'une
composition pharmaceutique - destinée au traitement des maladies
5 dégénératives oculaires.

2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le composé est en
outre un ligand d'un récepteur périphérique aux benzodiazépines.

10 3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que le composé
est choisi parmi les composés de la famille des pyrazolopyridines.

4. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que le composé est
l'étazolate ou le tracazolate, de préférence l'étazolate.

15 5. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que le composé est
choisi parmi les composés suivants :

20 Ester éthylique de l'acide 4-butylamino-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-
carboxylique

1-(4-amino-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-1-yl)-β-*D*-1-deoxy-ribofuranose

25 Ester éthylique de l'acide 1-ethyl-4-(*N*'-isopropylidene-hydrazino)-1*H*-
pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique (SQ 20009),

4-amino-6-methyl-1-*n*-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine

30 Ester éthylique de l'acide 4-Amino-1-ethyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-
5-carboxylique (desbutyl tracacolate),

4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxamide,

35 Ester éthylique de l'acide 1-ethyl-6-methyl-4-methylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-
b]pyridine-5-carboxylique,

Ester éthylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-propyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-
5-carboxylique,

Ester éthylique de l'acide 1-ethyl-4-ethylamino-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

Ester éthylique de l'acide 4-amino-1-butyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

5-(4-amino-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-1-yl)-2-hydroxymethyl-tetrahydro-furan-3-ol,

ester allylique de l'acide 1-allyl-4-amino-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester éthylique de l'acide 4-amino-1-ethyl-3,6-dimethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester éthylique de l'acide 4-diméthylamino-1-ethyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester éthylique de l'acide 1-ethyl-6-methyl-4-propylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester éthylique de l'acide 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester éthylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pent-4-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

4-amino-1-but-3-enyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-allylamide,

4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-isopropylamide,

4-amino-1-pentyl-N-n-propyl-1*H*-pyrazolo-[3,4-*b*]pyridine-5-carboxamide,

ester allylique de l'acide 4-amino-1-butyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester éthylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-prop-2-ynylamide

ester allylique de l'acide 4-amino-1-(3-méthyl-butyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo<3,4-*b*>pyridine-5-N-(2-propenyl)carboxamide,

ester allylique de l'acide 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-butylamide,

5

ester allylique de l'acide 4-amino-1-but-3-ynyl-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

10

ester allylique de l'acide 4-amino-1-but-3-enyl-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-allylamide,

15

ester allylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester allylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-(3-méthyl-butyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

20

ester isobutylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-butylamide,

25

ester allylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-(3-méthyl-but-2-enyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-cyclopropylamide,

30

ethyl 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-hydroxamate,

ester prop-2-ynylque de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

35

ester allylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pent-4-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester allylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pent-4-enyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

40

4-amino-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-propylamide,

4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-cyclopropylmethyl-amide,

45

ester 2-méthyl-allylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

4-Amino-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-allylamide (ICI 190,622),

4-amino-1-pent-4-ynyl-N-2-propenyl-1H-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxamide,

4-amino-1-pent-3-ynyl-1H-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-prop-2-ynylamide,

4-amino-1-pentyl-1H-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-but-2-ynylamide,

ester allylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pent-3-ynyl-1H-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester allylique de l'acide 4-amino-1-(2-cyclopropyl-éthyl)-6-méthyl-1H-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester allylique de l'acide 4-amino-1-hex-5-ynyl-6-méthyl-1H-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

4-amino-1-pent-3-ynyl-1H-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-cyclopropylmethyl-amide,

ester but-3-énylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1H-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester cyclopropylméthylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1H-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

4-butylamino-1-pentyl-1H-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-allylamide,

ester 2-cyclopropyl-éthylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1H-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester cyclopropylméthylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pent-3-ynyl-1H-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester cyclopropylméthylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pent-4-ynyl-1H-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester éthylique de l'acide 4-amino-1-benzyl-6-méthyl-1H-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

4-amino-1-pentyl-1H-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-benzylamide,

4-amino-1-pentyl-1H-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-phenylamide,

ester benzylque de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1H-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

4-Azido-1-β-D-ribofuranosylpyrazolo[3,4-*b*]pyridine,

1-pent-3-ynyl-N-2-propenyl-4-propionamido-1H-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxamide,

5 2-(4-amino-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-1-yl)-5-hydroxymethyl-tetrahydro-furan-3,4-diol,

2-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-ethanol,

10 3-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-propan-1-ol,

ester propylique de l'acide 3-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-acétique,

15 ester éthylique de l'acide 2-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-propionique,

ester éthylique de l'acide 2-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-pentanoïque,

20 ester éthylique de l'acide 2-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-benzoïque,

ester propylique de l'acide 3-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-pentanoïque,

25 *N*-benzylidene-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,

N-furan-2-ylmethylene-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,

30 *N*-(4-fluoro-benzylidene)-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,

35 *N*-(3-furan-2-yl-allylidene)-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,

N-(4-methoxy-benzylidene)-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,

40 4-[(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazonomethyl]-benzonitrile,

N-benzo[1,3]dioxol-5-ylmethylene-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,

45 *N*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(4-nitro-benzylidene)-hydrazine,

N-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(2-nitro-benzylidene)-hydrazine,

5 *N*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(4-trifluoromethyl-benzylidene)-hydrazine,

N-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(5-nitro-furan-2-ylmethylene)-hydrazine,

10 *N*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(2-trifluoromethyl-benzylidene)-hydrazine,

N-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(6-nitro-benzo[1,3]dioxol-5-ylmethylene)-hydrazine,

15 Acide 4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

20 4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-(pyridin-4-ylmethyl)-amide,

4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-(tetrahydro-furan-2-ylmethyl)-amide,

25 4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-(5-hydroxy-pentyl)-amide,

4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-[3-(2-oxo-pyrrolidin-1-yl)-propyl]-amide,

30 ester éthylique de l'acide 4-*tert*-butylamino-1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

35 ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-cyclopropylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-propylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

40 ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-phenylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester éthylique de l'acide 4-butylamino-1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

45 ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-(2-ethoxy-ethylamino)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester éthylique de l'acide 4-benzylamino-1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-carboxylique, et

5 ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-phenethylamino-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-carboxylique.

6. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le composé est un acide nucléique anti-sens capable d'inhiber la transcription du gène de la PDE4B ou la traduction du messenger correspondant.

10

7. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des dégénérescences de la rétine.

15

8. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement de la rétinite pigmentaire, de la dégénérescence maculaire, du glaucome ou des rétinopathies.

20

9. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à inhiber ou réduire l'excitotoxicité neuronale lors des maladies dégénératives oculaires.

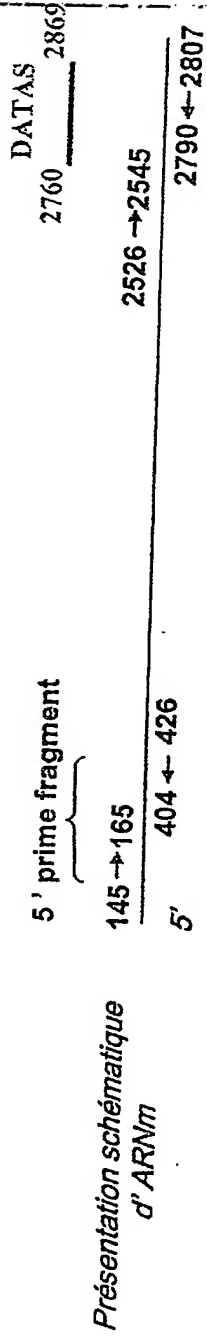
25 10. Utilisation de l'étazolate pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des maladies dégénératives oculaires.

30 11. Utilisation d'au moins un composé inhibiteur de PDE4 appartenant à la famille des pyrazolopyridines, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à augmenter la survie neuronale chez les patients atteints de maladies dégénératives oculaires.

12. Composition pharmaceutique comprenant un composé de la famille des pyrazolopyridines et un excipient acceptable sur le plan pharmaceutique et permettant une administration intra-oculaire.

13. Composition selon la revendication 12, caractérisée en ce que le composé est tel que défini dans les revendications 4 et 5.

Analyse d'expression d'isoforme de PDE4B dans le cerveau par PCR semi-quantitative



Fragment DATAS

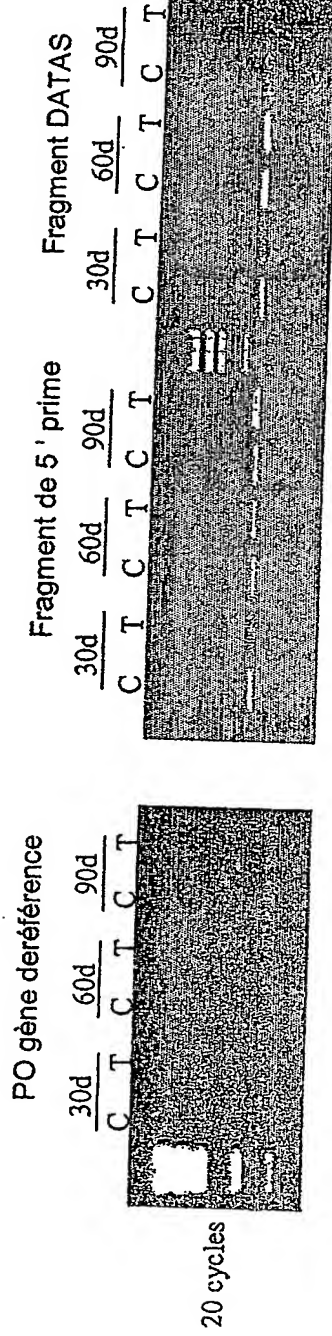


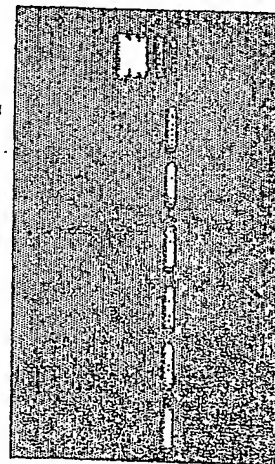
Figure 1A

MUSCLE
 PDE4B (5')
 145 → 165
 404 ← 426
 2526 → 2545
 2760 → 2869
 2790 ← 2807

PDE4B (DATAS)

PO

30d 60d 90d
 C T C T C T

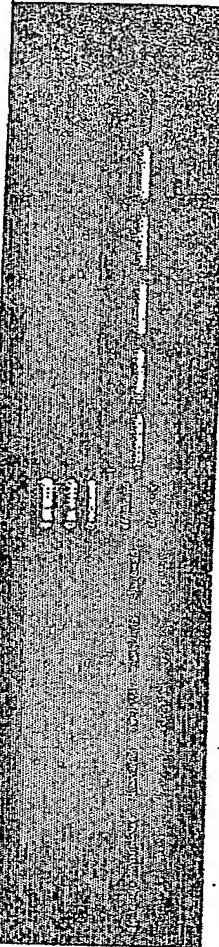


20 cycles

2/6

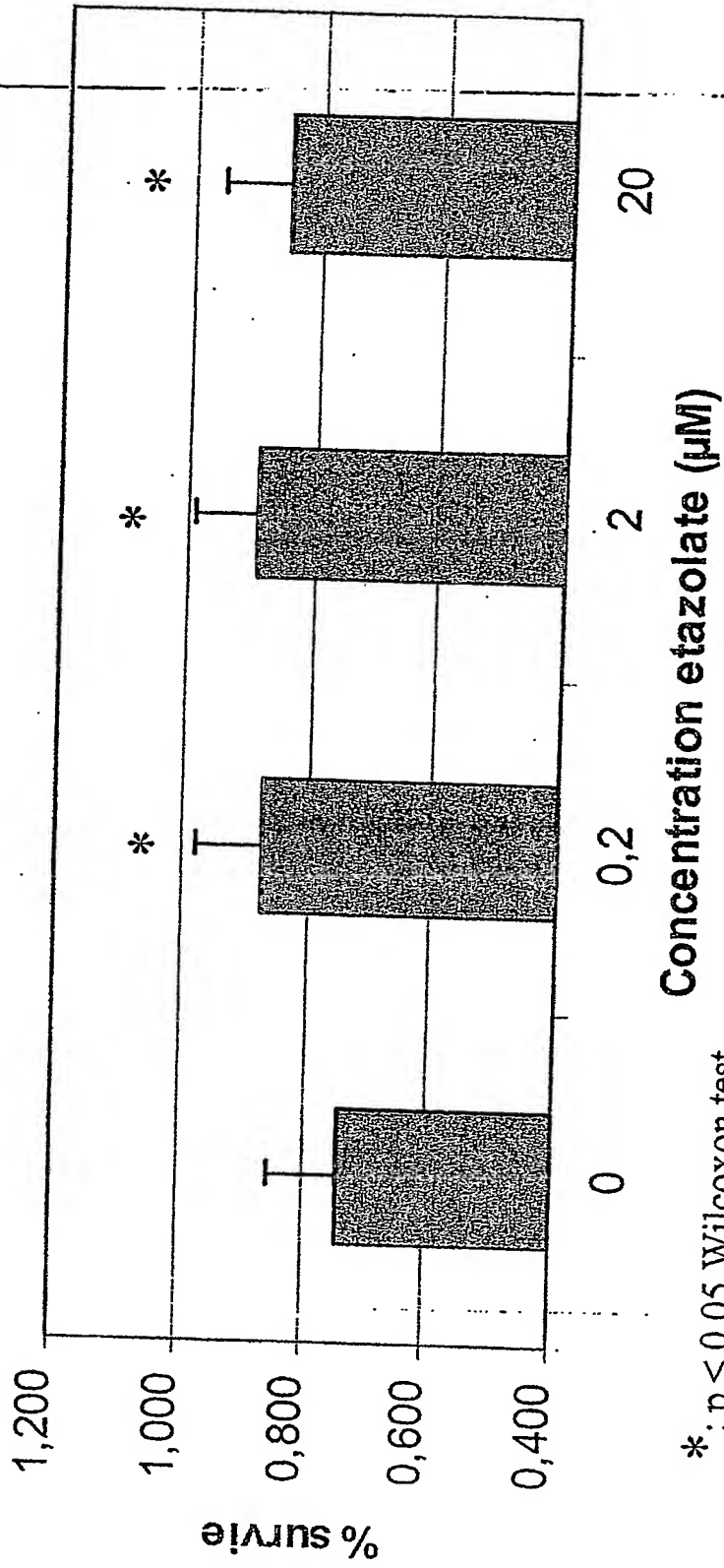
PDE4B (5') PDE4B (DATAS)

30d 60d 90d 30d 60d 90d
 C T C T C T C T C T C T



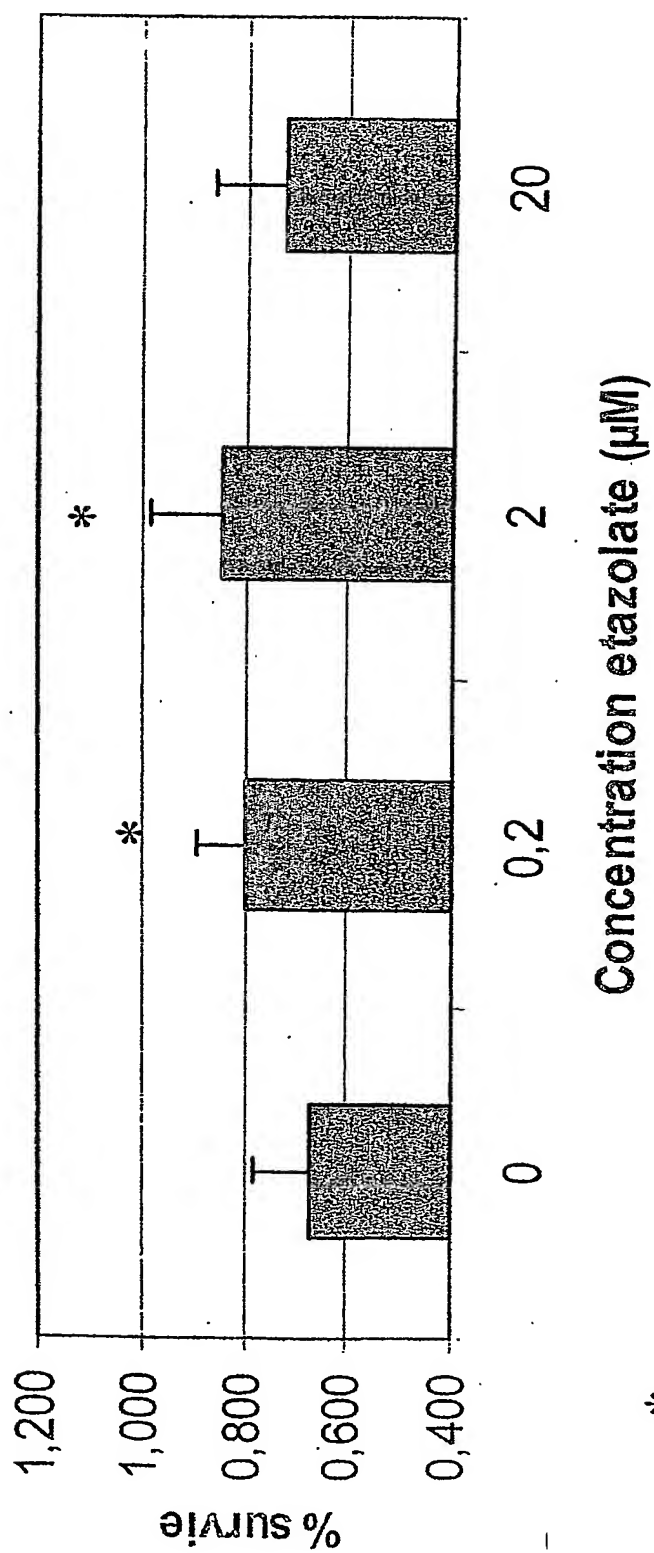
25 cycles

Figure1B



*: p < 0.05 Wilcoxon test

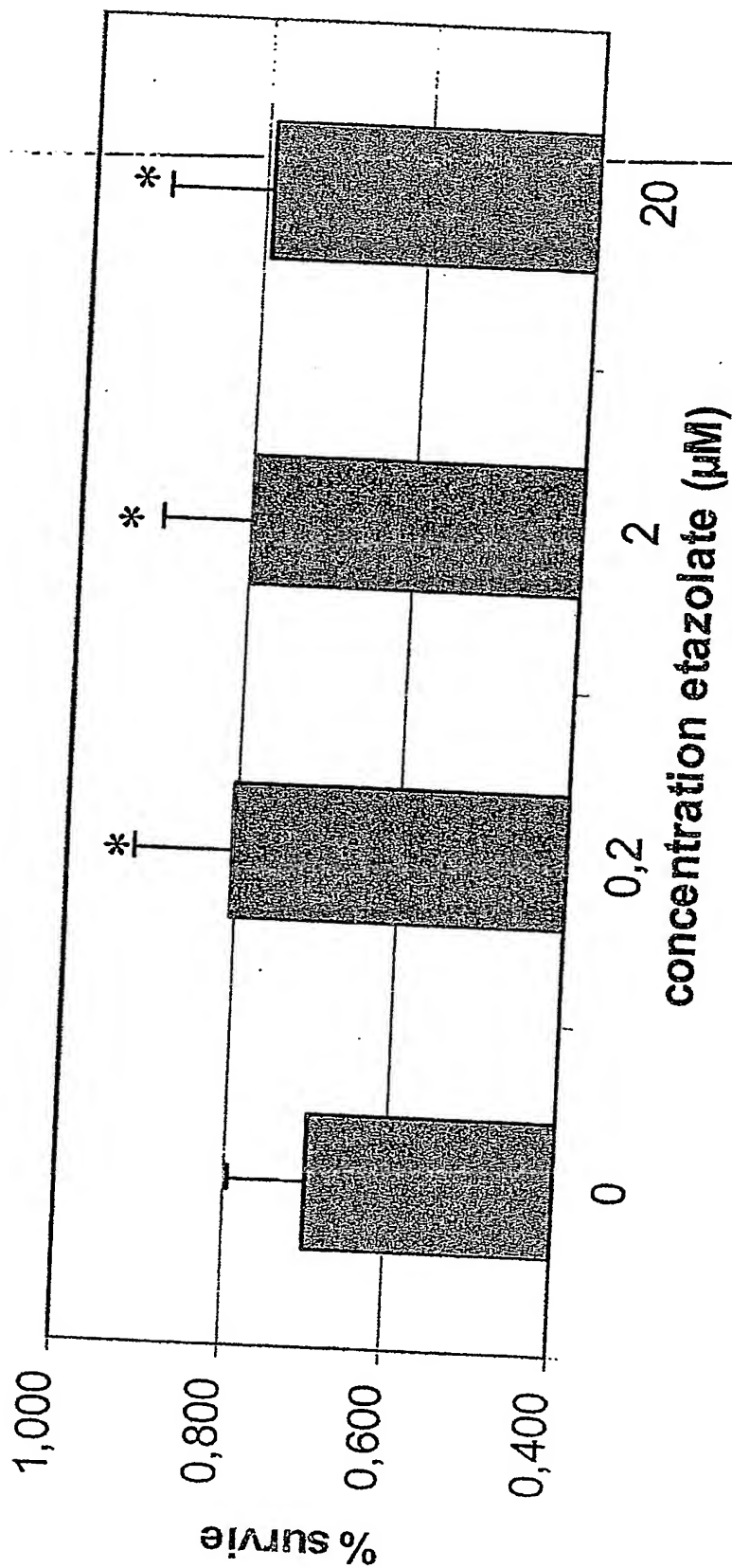
Figure 2



*: p < 0.05 Wilcoxon test

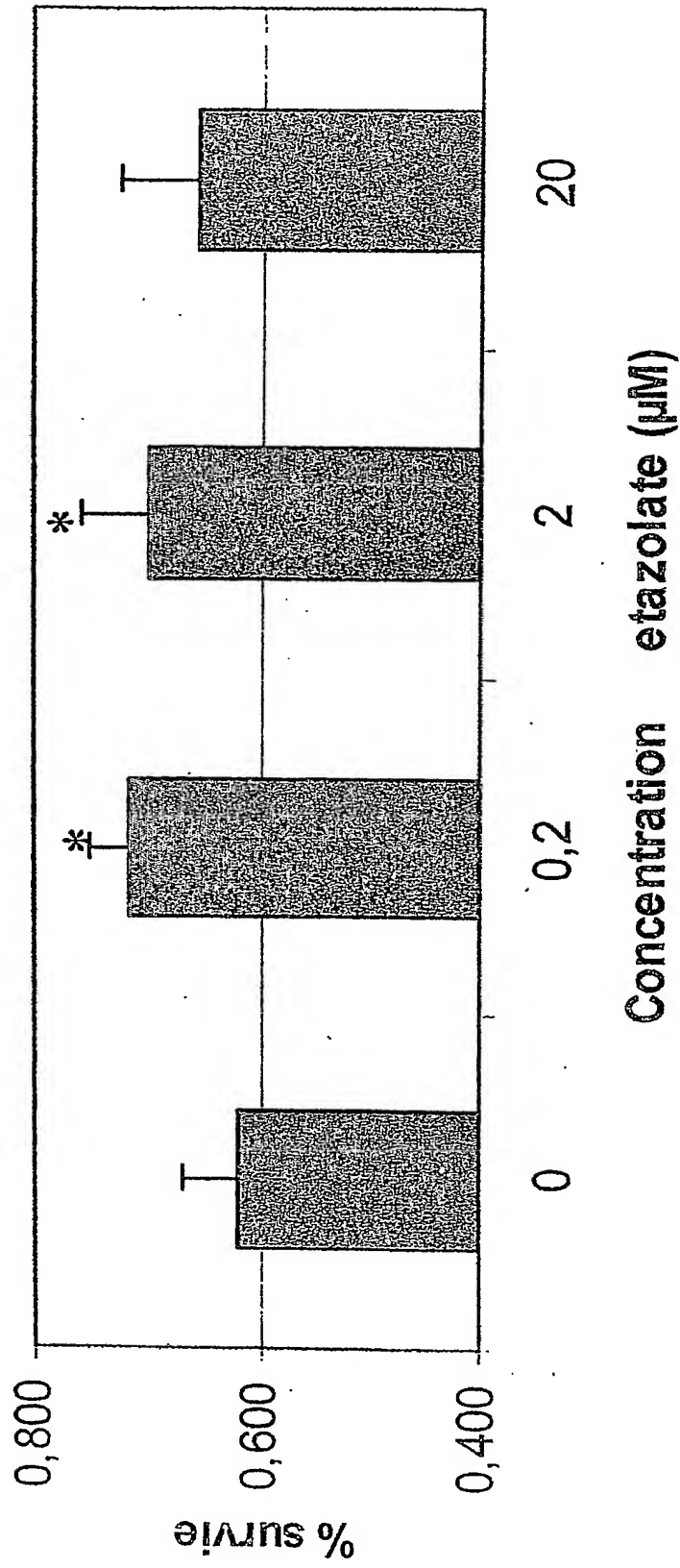
Figure 3

5/6



*: p < 0.05 Wilcoxon test

Figure 4



*: p < 0.05 Wilcoxon test

Figure 5

SEQUENCE LISTING

<110> Exonhit Therapeutics

<120> Méthodes et compositions pour le traitement de
pathologies dégénératives oculaires

<130> B0189FR

<140>

<141>

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2912

<212> DNA

<213> souris

<220>

<221> CDS

<222> (218)..(2383)

<400> 1

aaaggcagcc tgataaagct ccttgtgaca ggctgtcttg ccagtctccc agtatgctcc 60

tcttgctctg aagtgtcca ggattgaaac cacagcttcc caaattagcc tgggaagagt 120

gtgcggaccc agcagccttt taaccgcgct cagtgccttt gctatgttca agactgctgt 180

tttgatggt gaatgctagc tagcactoca tcgagac atg aca gca aaa aat tct 235

Met Thr Ala Lys Asn Ser

1

5

cca aaa gaa ttt act gct tcg gaa tct gag gtt tgc ata aag act ttc 283

Pro Lys Glu Phe Thr Ala Ser Glu Ser Glu Val Cys Ile Lys Thr Phe

10

15

20

aag gag cag atg cgc ttg gaa ctt gag ctt cca aag cta cca gga aac 331

Lys Glu Gln Met Arg Leu Glu Leu Glu Leu Pro Lys Leu Pro Gly Asn

25

30

35

aga cct aca tct ccc aaa att tct cca cgc agt tca cca agg aat tca 379

Arg Pro Thr Ser Pro Lys Ile Ser Pro Arg Ser Ser Pro Arg Asn Ser

40

45

50

cca tgc ttt ttc aga aag ttg ctg gtg aat aaa agc atc cga cag cgg	427
Pro Cys Phe Phe Arg Lys Leu Leu Val Asn Lys Ser Ile Arg Gln Arg	
55 60 65 70	
cgt cgc ttc acg gtg gct cat aca tgc ttt gat gtg gaa aat ggc cct	475
Arg Arg Phe Thr Val Ala His Thr Cys Phe Asp Val Glu Asn Gly Pro	
75 80 85	
tct cca ggt cgg agc cca ctg gac cct caa gcc ggc tct tcg tcg gga	523
Ser Pro Gly Arg Ser Pro Leu Asp Pro Gln Ala Gly Ser Ser Ser Gly	
90 95 100	
ctg gta ctt cat gcc gcc ttt cct ggg cac agc cag cgc agg gag tcg	571
Leu Val Leu His Ala Ala Phe Pro Gly His Ser Gln Arg Arg Glu Ser	
105 110 115	
ttc ctc tac gat ctt gac agc gac tat gac ttg tca cca aaa gcg atg	619
Phe Leu Tyr Asp Leu Asp Ser Asp Tyr Asp Leu Ser Pro Lys Ala Met	
120 125 130	
tcc agg aac tca tca ctt ccc agt gag caa cac ggc gat gac ctg att	667
Ser Arg Asn Ser Ser Leu Pro Ser Glu Gln His Gly Asp Asp Leu Ile	
135 140 145 150	
gtc act cct ttt gcc cag gtt ctt gcc agc ttg cga agt gta aga aac	715
Val Thr Pro Phe Ala Gln Val Leu Ala Ser Leu Arg Ser Val Arg Asn	
155 160 165	
aac ttc acc ctg ctg acg aac ctt cat gga gcg ccg aac aag agg tca	763
Asn Phe Thr Leu Leu Thr Asn Leu His Gly Ala Pro Asn Lys Arg Ser	
170 175 180	
cca gcg gct agt cag gct cca gtc tcc aga gtc agc ctg caa gag gaa	811
Pro Ala Ala Ser Gln Ala Pro Val Ser Arg Val Ser Leu Gln Glu Glu	
185 190 195	
tca tat cag aaa cta gca atg gag acg ctg gag gaa cta gac tgg tgc	859
Ser Tyr Gln Lys Leu Ala Met Glu Thr Leu Glu Glu Leu Asp Trp Cys	
200 205 210	
cta gac cag cta gag acc atc cag acc tac cgc tct gtc agc gag atg	907
Leu Asp Gln Leu Glu Thr Ile Gln Thr Tyr Arg Ser Val Ser Glu Met	
215 220 225 230	
gct tca aac aag ttc aaa agg atg ctg aac cgg gag ctg aca cac ctc	955
Ala Ser Asn Lys Phe Lys Arg Met Leu Asn Arg Glu Leu Thr His Leu	
235 240 245	

tca gag atg agc aga tca ggg aac cag gtg tct gag tac att tca aac	1003
Ser Glu Met Ser Arg Ser Gly Asn Gln Val Ser Glu Tyr Ile Ser Asn	
250 255 260	
acg ttc tta gac aag cag aac gat gtg gaa atc cca tct ccc acg cag	1051
Thr Phe Leu Asp Lys Gln Asn Asp Val Glu Ile Pro Ser Pro Thr Gln	
265 270 275	
aag gac agg gag aag aag aag aag cag cag ctc atg acc cag ata agt	1099
Lys Asp Arg Glu Lys Lys Lys Lys Gln Gln Leu Met Thr Gln Ile Ser	
280 285 290	
gga gtg aag aaa ctg atg cac agc tca agc ctg aac aac aca agc atc	1147
Gly Val Lys Lys Leu Met His Ser Ser Ser Leu Asn Asn Thr Ser Ile	
295 300 305 310	
tca cgc ttc ggg atc aac acg gaa aat gag gat cat cta gcc aag gag	1195
Ser Arg Phe Gly Ile Asn Thr Glu Asn Glu Asp His Leu Ala Lys Glu	
315 320 325	
ctg gaa gac ctg aac aaa tgg ggc ctt aac atc ttc aat gtg gct ggg	1243
Leu Glu Asp Leu Asn Lys Trp Gly Leu Asn Ile Phe Asn Val Ala Gly	
330 335 340	
tac tca cat aat cgg ccc ctt acg tgc atc atg tat gca ata ttc cag	1291
Tyr Ser His Asn Arg Pro Leu Thr Cys Ile Met Tyr Ala Ile Phe Gln	
345 350 355	
gaa aga gac ctt ctg aag acg ttt aaa atc tca tct gac acc ttt gta	1339
Glu Arg Asp Leu Leu Lys Thr Phe Lys Ile Ser Ser Asp Thr Phe Val	
360 365 370	
acc tac atg atg act tta gaa gac cat tac cat tct gat gtg gca tat	1387
Thr Tyr Met Met Thr Leu Glu Asp His Tyr His Ser Asp Val Ala Tyr	
375 380 385 390	
cac aac agc ctg cat gct gct gac gtg gcc cag tca act cac gtt ctc	1435
His Asn Ser Leu His Ala Ala Asp Val Ala Gln Ser Thr His Val Leu	
395 400 405	
ctt tct acg ccg gca ctg gat gct gtc ttc aca gac ctg gaa atc ctg	1483
Leu Ser Thr Pro Ala Leu Asp Ala Val Phe Thr Asp Leu Glu Ile Leu	
410 415 420	
gct gcc att ttt gca gct gcc atc cat gat gtc gat cat cct gga gtc	1531
Ala Ala Ile Phe Ala Ala Ala Ile His Asp Val Asp His Pro Gly Val	
425 430 435	

tcc aat cag ttt ctc atc aat aca aat tct gaa ctt gct ttg atg tat 1579
 Ser Asn Gln Phe Leu Ile Asn Thr Asn Ser Glu Leu Ala Leu Met Tyr
 440 445 450

aat gat gaa tct gtt ctg gaa aac cat cac ctt gct gtg gga ttc aaa 1627
 Asn Asp Glu Ser Val Leu Glu Asn His His Leu Ala Val Gly Phe Lys
 455 460 465 470

ttg cta caa gag gaa cac tgc gac atc ttt cag aat ctt acc aag aag 1675
 Leu Leu Gln Glu Glu His Cys Asp Ile Phe Gln Asn Leu Thr Lys Lys
 475 480 485

caa cgc cag aca ctc agg aaa atg gtg att gac atg gtg ttg gca act 1723
 Gln Arg Gln Thr Leu Arg Lys Met Val Ile Asp Met Val Leu Ala Thr
 490 495 500

gat atg tcc aaa cac atg agc ctc ctg gca gac ctt aaa aca atg gta 1771
 Asp Met Ser Lys His Met Ser Leu Leu Ala Asp Leu Lys Thr Met Val
 505 510 515

gaa acc aag aag gtg aca agc tcc ggt gtt ctc ctc ctg gac aac tat 1819
 Glu Thr Lys Lys Val Thr Ser Ser Gly Val Leu Leu Leu Asp Asn Tyr
 520 525 530

act gac cgg ata cag gtt ctt cgc aac atg gta cac tgt gca gac ctg 1867
 Thr Asp Arg Ile Gln Val Leu Arg Asn Met Val His Cys Ala Asp Leu
 535 540 545 550

agc aac ccc acc aag tcc ttg gaa ttg tat cgg caa tgg acc gat cgt 1915
 Ser Asn Pro Thr Lys Ser Leu Glu Leu Tyr Arg Gln Trp Thr Asp Arg
 555 560 565

atc atg gag gag ttt ttc cag cag gga gac aaa gaa cgg gag agg gga 1963
 Ile Met Glu Glu Phe Phe Gln Gln Gly Asp Lys Glu Arg Glu Arg Gly
 570 575 580

atg gag att agc cca atg tgt gat aag cac aca gct tct gtg gaa aaa 2011
 Met Glu Ile Ser Pro Met Cys Asp Lys His Thr Ala Ser Val Glu Lys
 585 590 595

tcc cag gtt ggt ttc att gac tac att gtc cat cca ctg tgg gag acc 2059
 Ser Gln Val Gly Phe Ile Asp Tyr Ile Val His Pro Leu Trp Glu Thr
 600 605 610

tgg gca gac ctg gtt caa ccg gat gct caa gat att ctg gat aca cta 2107
 Trp Ala Asp Leu Val Gln Pro Asp Ala Gln Asp Ile Leu Asp Thr Leu
 615 620 625 630

gaa gat aac agg aac tgg tac cag agt atg ata ccc cag agc cct tcc 2155
 Glu Asp Asn Arg Asn Trp Tyr Gln Ser Met Ile Pro Gln Ser Pro Ser
 635 640 645

ccg cca ctg gat gag agg agc agg gac tgc caa ggc ctg atg gag aag 2203
 Pro Pro Leu Asp Glu Arg Ser Arg Asp Cys Gln Gly Leu Met Glu Lys
 650 655 660

ttt cag ttt gaa ctg acc ctt gag gaa gag gat tct gag gga ccg gaa 2251
 Phe Gln Phe Glu Leu Thr Leu Glu Glu Glu Asp Ser Glu Gly Pro Glu
 665 670 675

aag gag gga gaa ggc cac agc tat ttc agc agc aca aag acg ctt tgt 2299
 Lys Glu Gly Glu Gly His Ser Tyr Phe Ser Ser Thr Lys Thr Leu Cys
 680 685 690

gtg att gat cca gag aac agg gat tct ctg gaa gag act gac ata gac 2347
 Val Ile Asp Pro Glu Asn Arg Asp Ser Leu Glu Glu Thr Asp Ile Asp
 695 700 705 710

att gca aca gaa gac aag tct ccg atc gac aca taa tctctctccc 2393
 Ile Ala Thr Glu Asp Lys Ser Pro Ile Asp Thr
 715 720

tctgtgtgga gatgaacatt ccacccttga ctgagcatgc ccgctgagtg gtaggggtcac 2453

ctaccatggc caaggcctgc acaggacaaa ggccacctgg cctttccagt tacttgagtt 2513

tggagccaga atgccaggcc gtgaagcaaa tagcagttcc atgctgtctt gccttgccctg 2573

caagcttggc ggagacccgc agctgtatgt ggtagtagag gccagttccc atcaaagcta 2633

aaatggcttg aaaacagagg acacaaagct gagagattgc tctgcactag gtgttgggaa 2693

gctgtcctga cagatgactg aactcactaa caacttcac tataaatctc accacccaac 2753

ccattgtctg ccaacctgtg tgcctttttt tgtaaaatgt tttcgcgtct ttgaaatgcc 2813

tgttgaatat ctagagttta gtaccaactt ctacaaactt ttttgagtct ttcttgaaaa 2873

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2912

<210> 2

<211> 721

<212> PRT

<213> souris

<400> 2

```

Met Thr Ala Lys Asn Ser Pro Lys Glu Phe Thr Ala Ser Glu Ser Glu
  1           5           10           15
Val Cys Ile Lys Thr Phe Lys Glu Gln Met Arg Leu Glu Leu Glu Leu
      20           25           30
Pro Lys Leu Pro Gly Asn Arg Pro Thr Ser Pro Lys Ile Ser Pro Arg
      35           40           45
Ser Ser Pro Arg Asn Ser Pro Cys Phe Phe Arg Lys Leu Leu Val Asn
      50           55           60
Lys Ser Ile Arg Gln Arg Arg Arg Phe Thr Val Ala His Thr Cys Phe
      65           70           75           80
Asp Val Glu Asn Gly Pro Ser Pro Gly Arg Ser Pro Leu Asp Pro Gln
      85           90           95
Ala Gly Ser Ser Ser Gly Leu Val Leu His Ala Ala Phe Pro Gly His
      100          105          110
Ser Gln Arg Arg Glu Ser Phe Leu Tyr Asp Leu Asp Ser Asp Tyr Asp
      115          120          125
Leu Ser Pro Lys Ala Met Ser Arg Asn Ser Ser Leu Pro Ser Glu Gln
      130          135          140
His Gly Asp Asp Leu Ile Val Thr Pro Phe Ala Gln Val Leu Ala Ser
      145          150          155          160
Leu Arg Ser Val Arg Asn Asn Phe Thr Leu Leu Thr Asn Leu His Gly
      165          170          175
Ala Pro Asn Lys Arg Ser Pro Ala Ala Ser Gln Ala Pro Val Ser Arg
      180          185          190
Val Ser Leu Gln Glu Glu Ser Tyr Gln Lys Leu Ala Met Glu Thr Leu
      195          200          205
Glu Glu Leu Asp Trp Cys Leu Asp Gln Leu Glu Thr Ile Gln Thr Tyr
      210          215          220
Arg Ser Val Ser Glu Met Ala Ser Asn Lys Phe Lys Arg Met Leu Asn
      225          230          235          240
Arg Glu Leu Thr His Leu Ser Glu Met Ser Arg Ser Gly Asn Gln Val
      245          250          255
Ser Glu Tyr Ile Ser Asn Thr Phe Leu Asp Lys Gln Asn Asp Val Glu
      260          265          270
Ile Pro Ser Pro Thr Gln Lys Asp Arg Glu Lys Lys Lys Lys Gln Gln
      275          280          285
Leu Met Thr Gln Ile Ser Gly Val Lys Lys Leu Met His Ser Ser Ser
      290          295          300
Leu Asn Asn Thr Ser Ile Ser Arg Phe Gly Ile Asn Thr Glu Asn Glu
      305          310          315          320
Asp His Leu Ala Lys Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Trp Gly Leu Asn
      325          330          335
Ile Phe Asn Val Ala Gly Tyr Ser His Asn Arg Pro Leu Thr Cys Ile
      340          345          350
Met Tyr Ala Ile Phe Gln Glu Arg Asp Leu Leu Lys Thr Phe Lys Ile
      355          360          365
Ser Ser Asp Thr Phe Val Thr Tyr Met Met Thr Leu Glu Asp His Tyr

```

370	375	380
His Ser Asp Val Ala Tyr	His Asn Ser Leu His	Ala Ala Asp Val Ala
385	390	395
Gln Ser Thr His Val Leu	Leu Ser Thr Pro Ala Leu	Asp Ala Val Phe
405	410	415
Thr Asp Leu Glu Ile Leu	Ala Ala Ile Phe Ala Ala	Ile His Asp
420	425	430
Val Asp His Pro Gly Val	Ser Asn Gln Phe Leu Ile	Asn Thr Asn Ser
435	440	445
Glu Leu Ala Leu Met Tyr	Asn Asp Glu Ser Val Leu	Glu Asn His His
450	455	460
Leu Ala Val Gly Phe Lys	Leu Leu Gln Glu Glu His	Cys Asp Ile Phe
465	470	475
Gln Asn Leu Thr Lys Lys	Gln Arg Gln Thr Leu Arg	Lys Met Val Ile
485	490	495
Asp Met Val Leu Ala Thr	Asp Met Ser Lys His Met	Ser Leu Leu Ala
500	505	510
Asp Leu Lys Thr Met Val	Glu Thr Lys Lys Val Thr	Ser Ser Gly Val
515	520	525
Leu Leu Leu Asp Asn Tyr	Thr Asp Arg Ile Gln Val	Leu Arg Asn Met
530	535	540
Val His Cys Ala Asp Leu	Ser Asn Pro Thr Lys Ser	Leu Glu Leu Tyr
545	550	555
Arg Gln Trp Thr Asp Arg	Ile Met Glu Glu Phe Phe	Gln Gln Gly Asp
565	570	575
Lys Glu Arg Glu Arg Gly	Met Glu Ile Ser Pro Met	Cys Asp Lys His
580	585	590
Thr Ala Ser Val Glu Lys	Ser Gln Val Gly Phe Ile	Asp Tyr Ile Val
595	600	605
His Pro Leu Trp Glu Thr	Trp Ala Asp Leu Val Gln	Pro Asp Ala Gln
610	615	620
Asp Ile Leu Asp Thr Leu	Glu Asp Asn Arg Asn Trp	Tyr Gln Ser Met
625	630	635
Ile Pro Gln Ser Pro Ser	Pro Pro Leu Asp Glu Arg	Ser Arg Asp Cys
645	650	655
Gln Gly Leu Met Glu Lys	Phe Gln Phe Glu Leu Thr	Leu Glu Glu Glu
660	665	670
Asp Ser Glu Gly Pro Glu	Lys Glu Gly Glu Gly His	Ser Tyr Phe Ser
675	680	685
Ser Thr Lys Thr Leu Cys	Val Ile Asp Pro Glu Asn	Arg Asp Ser Leu
690	695	700
Glu Glu Thr Asp Ile Asp	Ile Ala Thr Glu Asp Lys	Ser Pro Ile Asp
705	710	715
Thr		720

<211> 4068
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (766)..(2460)
<223> PDE4B

<400> 3

gaattcctcc tctcttcacc ccgttagctg ttttcaatgt aatgctgccg tccttctctt 60
gcactgcctt ctgcgctaac acctccattc ctgtttataa ccgtgtattt attacttaat 120
gtatataatg taatgttttg taagttatta atttatatat ctaacattgc ctgccaatgg 180
tgggtgttaaa tttgtgtaga aaactctgcc taagagttac gactttttct tgtaatgttt 240
tgtattgtgt attatataac ccaaactgca cttagtagag acatatggcc cccttggcag 300
agaggacagg ggtgggcttt tgttcaaagg gtctgccctt tccctgcctg agttgctact 360
tctgcacaac ccctttatga accagttttc accccaattt tgactgtttc atttagaaga 420
aaagcaaaat gagaaaaagc tttcctcatt tctccttgag atggcaaagc actcagaaat 480
gacatcacat accctaaaga accctgggat gactaaggca gagagagtct gagaaaactc 540
tttggtgctt ctgccttttag ttttaggaca catttatgca gatgagctta taagagaccg 600
ttccctccgc cttcttcctc agaggaagtt tcttggtaga tcaccgacac ctcattccagg 660
cgggggggtg gggggaaact tggcaccagc catcccaggc agagcaccac tgtgatttgt 720
tctcctggtg gagagagctg gaaggaagga gccagcgtgc aaata atg aag gag cac 777
Met Lys Glu His

1

ggg ggc acc ttc agt agc acc gga atc agc ggt ggt agc ggt gac tct 825
Gly Gly Thr Phe Ser Ser Thr Gly Ile Ser Gly Gly Ser Gly Asp Ser
5 10 15 20

gct atg gac agc ctg cag ccg ctc cag cct aac tac atg cct gtg tgt 873
Ala Met Asp Ser Leu Gln Pro Leu Gln Pro Asn Tyr Met Pro Val Cys
25 30 35

ttg ttt gca gaa gaa tct tat caa aaa tta gca atg gaa acg ctg gag 921
Leu Phe Ala Glu Glu Ser Tyr Gln Lys Leu Ala Met Glu Thr Leu Glu

40

45

50

gaa tta gac tgg tgt tta gac cag cta gag acc ata cag acc tac cgg 969
 Glu Leu Asp Trp Cys Leu Asp Gln Leu Glu Thr Ile Gln Thr Tyr Arg
 55 60 65

tct gtc agt gag atg gct tct aac aag ttc aaa aga atg ctg aac cgg 1017
 Ser Val Ser Glu Met Ala Ser Asn Lys Phe Lys Arg Met Leu Asn Arg
 70 75 80

gag ctg aca cac ctc tca gag atg agc cga tca ggg aac cag gtg tct 1065
 Glu Leu Thr His Leu Ser Glu Met Ser Arg Ser Gly Asn Gln Val Ser
 85 90 95 100

gaa tac att tca aat act ttc tta gac aag cag aat gat gtg gag atc 1113
 Glu Tyr Ile Ser Asn Thr Phe Leu Asp Lys Gln Asn Asp Val Glu Ile
 105 110 115

cca tct cct acc cag aaa gac agg gag aaa aag aaa aag cag cag ctc 1161
 Pro Ser Pro Thr Gln Lys Asp Arg Glu Lys Lys Lys Lys Gln Gln Leu
 120 125 130

atg acc cag ata agt gga gtg aag aaa tta atg cat agt tca agc cta 1209
 Met Thr Gln Ile Ser Gly Val Lys Lys Leu Met His Ser Ser Ser Leu
 135 140 145

aac aat aca agc atc tca cgc ttt gga gtc aac act gaa aat gaa gat 1257
 Asn Asn Thr Ser Ile Ser Arg Phe Gly Val Asn Thr Glu Asn Glu Asp
 150 155 160

cac ctg gcc aag gag ctg gaa gac ctg aac aaa tgg ggt ctt aac atc 1305
 His Leu Ala Lys Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Trp Gly Leu Asn Ile
 165 170 175 180

ttt aat gtg gct gga tat tct cac aat aga ccc cta aca tgc atc atg 1353
 Phe Asn Val Ala Gly Tyr Ser His Asn Arg Pro Leu Thr Cys Ile Met
 185 190 195

tat gct ata ttc cag gaa aga gac ctc cta aag aca ttc aga atc tca 1401
 Tyr Ala Ile Phe Gln Glu Arg Asp Leu Leu Lys Thr Phe Arg Ile Ser
 200 205 210

tct gac aca ttt ata acc tac atg atg act tta gaa gac cat tac cat 1449
 Ser Asp Thr Phe Ile Thr Tyr Met Met Thr Leu Glu Asp His Tyr His
 215 220 225

tct gac gtg gca tat cac aac agc ctg cac gct gct gat gta gcc cag 1497
 Ser Asp Val Ala Tyr His Asn Ser Leu His Ala Ala Asp Val Ala Gln

230

235

240

tcg acc cat gtt ctc ctt tct aca cca gca tta gac gct gtc ttc aca 1545
 Ser Thr His Val Leu Leu Ser Thr Pro Ala Leu Asp Ala Val Phe Thr
 245 250 255 260

gat ttg gag atc ctg gct gcc att ttt gca gct gcc atc cat gac gtt 1593
 Asp Leu Glu Ile Leu Ala Ala Ile Phe Ala Ala Ala Ile His Asp Val
 265 270 275

gat cat cct gga gtc tcc aat cag ttt ctc atc aac aca aat tca gaa 1641
 Asp His Pro Gly Val Ser Asn Gln Phe Leu Ile Asn Thr Asn Ser Glu
 280 285 290

ctt gct ttg atg tat aat gat gaa tct gtg ttg gaa aat cat cac ctt 1689
 Leu Ala Leu Met Tyr Asn Asp Glu Ser Val Leu Glu Asn His His Leu
 295 300 305

gct gtg ggt ttc aaa ctg ctg caa gaa gaa cac tgt gac atc ttc atg 1737
 Ala Val Gly Phe Lys Leu Leu Gln Glu Glu His Cys Asp Ile Phe Met
 310 315 320

aat ctc acc aag aag cag cgt cag aca ctc agg aag atg gtt att gac 1785
 Asn Leu Thr Lys Lys Gln Arg Gln Thr Leu Arg Lys Met Val Ile Asp
 325 330 335 340

atg gtg tta gca act gat atg tct aaa cat atg agc ctg ctg gca gac 1833
 Met Val Leu Ala Thr Asp Met Ser Lys His Met Ser Leu Leu Ala Asp
 345 350 355

ctg aag aca atg gta gaa acg aag aaa gtt aca agt tca ggc gtt ctt 1881
 Leu Lys Thr Met Val Glu Thr Lys Lys Val Thr Ser Ser Gly Val Leu
 360 365 370

ctc cta gac aac tat acc gat cgc att cag gtc ctt cgc aac atg gta 1929
 Leu Leu Asp Asn Tyr Thr Asp Arg Ile Gln Val Leu Arg Asn Met Val
 375 380 385

cac tgt gca gac ctg agc aac ccc acc aag tcc ttg gaa ttg tat cgg 1977
 His Cys Ala Asp Leu Ser Asn Pro Thr Lys Ser Leu Glu Leu Tyr Arg
 390 395 400

caa tgg aca gac cgc atc atg gag gaa ttt ttc cag cag gga gac aaa 2025
 Gln Trp Thr Asp Arg Ile Met Glu Glu Phe Phe Gln Gln Gly Asp Lys
 405 410 415 420

gag cgg gag agg gga atg gaa att agc cca atg tgt gat aaa cac aca 2073
 Glu Arg Glu Arg Gly Met Glu Ile Ser Pro Met Cys Asp Lys His Thr

425

430

435

gct tct gtg gaa aaa tcc cag gtt ggt ttc atc gac tac att gtc cat 2121
Ala Ser Val Glu Lys Ser Gln Val Gly Phe Ile Asp Tyr Ile Val His
440 445 450

~~cca ttg tgg gag aca tgg gca gat ttg gta cag cct gat gct cag gac~~ 2169
Pro Leu Trp Glu Thr Trp Ala Asp Leu Val Gln Pro Asp Ala Gln Asp
455 460 465

att ctc gat acc tta gaa gat aac agg aac tgg tat cag agc atg ata 2217
Ile Leu Asp Thr Leu Glu Asp Asn Arg Asn Trp Tyr Gln Ser Met Ile
470 475 480

cct caa agt ccc tca cca cca ctg gac gag cag aac agg gac tgc cag 2265
Pro Gln Ser Pro Ser Pro Pro Leu Asp Glu Gln Asn Arg Asp Cys Gln
485 490 495 500

ggt ctg atg gag aag ttt cag ttt gaa ctg act ctc gat gag gaa gat 2313
Gly Leu Met Glu Lys Phe Gln Phe Glu Leu Thr Leu Asp Glu Glu Asp
505 510 515

tct gaa gga cct gag aag gag gga gag gga cac agc tat ttc agc agc 2361
Ser Glu Gly Pro Glu Lys Glu Gly Glu Gly His Ser Tyr Phe Ser Ser
520 525 530

aca aag acg ctt tgt gtg att gat cca gaa aac aga gat tcc ctg gga 2409
Thr Lys Thr Leu Cys Val Ile Asp Pro Glu Asn Arg Asp Ser Leu Gly
535 540 545

gag act gac ata gac att gca aca gaa gac aag tcc ccc gtg gat aca 2457
Glu Thr Asp Ile Asp Ile Ala Thr Glu Asp Lys Ser Pro Val Asp Thr
550 555 560

taa tccccctctc cctgtggaga tgaacattct atccttgatg agcatgccag 2510
565

ctatgtggta gggccagccc accatggggg ccaagacctg cacaggacaa gggccacctg 2570

gcctttcagt tacttgagtt tggagtcaga aagcaagacc aggaagcaaa tagcagctca 2630

ggaaatccca cggttgactt gccttgatgg caagcttggg ggagagggct gaagctgttg 2690

ctggggggccg attctgatca agacacatgg cttgaaaatg gaagacacaa aactgagaga 2750

tcattctgca ctaagtttctg ggaacttatc cccgacagtg actgaactca ctgactaata 2810

acttcattta tgaatcttct cacttgtecc ttgtctgcc aacctgtgtg ccttttttgt 2870
 aaaacatttt catgtcttta aaatgcctgt tgaatacctg gagtttagta tcaacttcta 2930
 cacagataag ctttcaaagt tgacaaactt ttttgactct ttctggaaaa gggaaagaaa 2990
 atagtcttcc ttctttcttg ggcaatatcc ttcactttac tacagttact ttgcaaaca 3050
 gacagaaagg atacacttct aaccacattt tacttccctc cctgtttgtc cagtccaact 3110
 ccacagtcac tcttaaaaact tctctctgtt tgccctgctc caacagtact tttaactttt 3170
 tgctgtaaac agaataaaaat tgaacaaatt agggggtaga aaggagcagt ggtgtcgttc 3230
 accgtgagag tctgcataga actcagcagt gtgccttgcg gtgtcttgga cctgcccccc 3290
 cacaggagtt gctacagtcc ctggccctgc ttcccatcct cctctcttca ccccgtttagc 3350
 tgttttcaat gtaatgctgc cgtccttctc ttgactgcc ttctgcgcta acacctccat 3410
 tcctgtttat aacctgtgat ttattactta atgtatataa tgtaatgttt tgtaagttat 3470
 taatttatat atctaacatt gcctgccaat ggtgggtgta aatttgtgta gaaaactctg 3530
 cctaagagtt acgacttttt ctgtaatgt tttgtattgt gtattatata acccaaactg 3590
 cacttagtag agacatatgg ccccttggc agagaggaca ggggtgggct tttgttcaaa 3650
 gggctgccc ttccctgcc tgagttgcta cttctgcaca acccttttat gaaccagttt 3710
 tggaacaat attctcacat tagatactaa atgggtttata ctgagctttt tacttttgta 3770
 tagcttgata ggggcagggg caatgggatg tagtttttac ccaggttcta tccaaatcta 3830
 tgtgggcatg agttgggtta taactggatc ctactatcat tgtggctttg gttcaaaagg 3890
 aaacactaca ttgctcaca gatgattctt ctgattcttc tgaatgctcc cgaactactg 3950
 actttgaaga ggtagcctcc tgccctgcat taagcaggaa tgtcatgttc cagttcatta 4010
 caaaagaaaa caataaaaca atgtgaattt ttataataaa aaaaaaaaaa aggaattc 4068

<210> 4
 <211> 564
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

```

Met Lys Glu His Gly Gly Thr Phe Ser Ser Thr Gly Ile Ser Gly Gly
 1          5          10          15
Ser Gly Asp Ser Ala Met Asp Ser Leu Gln Pro Leu Gln Pro Asn Tyr
 20          25          30
Met Pro Val Cys Leu Phe Ala Glu Glu Ser Tyr Gln Lys Leu Ala Met
 35          40          45
-----
Glu Thr Leu Glu Glu Leu Asp Trp Cys Leu Asp Gln Leu Glu Thr Ile
 50          55          60
Gln Thr Tyr Arg Ser Val Ser Glu Met Ala Ser Asn Lys Phe Lys Arg
 65          70          75          80
Met Leu Asn Arg Glu Leu Thr His Leu Ser Glu Met Ser Arg Ser Gly
 85          90          95
Asn Gln Val Ser Glu Tyr Ile Ser Asn Thr Phe Leu Asp Lys Gln Asn
 100          105          110
Asp Val Glu Ile Pro Ser Pro Thr Gln Lys Asp Arg Glu Lys Lys Lys
 115          120          125
Lys Gln Gln Leu Met Thr Gln Ile Ser Gly Val Lys Lys Leu Met His
 130          135          140
Ser Ser Ser Leu Asn Asn Thr Ser Ile Ser Arg Phe Gly Val Asn Thr
 145          150          155          160
Glu Asn Glu Asp His Leu Ala Lys Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Trp
 165          170          175
Gly Leu Asn Ile Phe Asn Val Ala Gly Tyr Ser His Asn Arg Pro Leu
 180          185          190
Thr Cys Ile Met Tyr Ala Ile Phe Gln Glu Arg Asp Leu Leu Lys Thr
 195          200          205
Phe Arg Ile Ser Ser Asp Thr Phe Ile Thr Tyr Met Met Thr Leu Glu
 210          215          220
Asp His Tyr His Ser Asp Val Ala Tyr His Asn Ser Leu His Ala Ala
 225          230          235          240
Asp Val Ala Gln Ser Thr His Val Leu Leu Ser Thr Pro Ala Leu Asp
 245          250          255
Ala Val Phe Thr Asp Leu Glu Ile Leu Ala Ala Ile Phe Ala Ala Ala
 260          265          270
Ile His Asp Val Asp His Pro Gly Val Ser Asn Gln Phe Leu Ile Asn
 275          280          285
Thr Asn Ser Glu Leu Ala Leu Met Tyr Asn Asp Glu Ser Val Leu Glu
 290          295          300
Asn His His Leu Ala Val Gly Phe Lys Leu Leu Gln Glu Glu His Cys
 305          310          315          320
Asp Ile Phe Met Asn Leu Thr Lys Lys Gln Arg Gln Thr Leu Arg Lys
 325          330          335
Met Val Ile Asp Met Val Leu Ala Thr Asp Met Ser Lys His Met Ser
 340          345          350
Leu Leu Ala Asp Leu Lys Thr Met Val Glu Thr Lys Lys Val Thr Ser
 355          360          365
Ser Gly Val Leu Leu Leu Asp Asn Tyr Thr Asp Arg Ile Gln Val Leu

```

370	375	380
Arg Asn Met Val His Cys Ala Asp Leu Ser Asn Pro Thr Lys Ser Leu		
385	390	395
Glu Leu Tyr Arg Gln Trp Thr Asp Arg Ile Met Glu Glu Phe Phe Gln		400
	405	410
Gln Gly Asp Lys Glu Arg Glu Arg Gly Met Glu Ile Ser Pro Met Cys		415
	420	425
Asp Lys His Thr Ala Ser Val Glu Lys Ser Gln Val Gly Phe Ile Asp		430
	435	440
Tyr Ile Val His Pro Leu Trp Glu Thr Trp Ala Asp Leu Val Gln Pro		445
	450	455
Asp Ala Gln Asp Ile Leu Asp Thr Leu Glu Asp Asn Arg Asn Trp Tyr		460
	465	470
Gln Ser Met Ile Pro Gln Ser Pro Ser Pro Pro Leu Asp Glu Gln Asn		475
	485	490
Arg Asp Cys Gln Gly Leu Met Glu Lys Phe Gln Phe Glu Leu Thr Leu		495
	500	505
Asp Glu Glu Asp Ser Glu Gly Pro Glu Lys Glu Gly Glu Gly His Ser		510
	515	520
Tyr Phe Ser Ser Thr Lys Thr Leu Cys Val Ile Asp Pro Glu Asn Arg		525
	530	535
Asp Ser Leu Gly Glu Thr Asp Ile Asp Ile Ala Thr Glu Asp Lys Ser		540
	545	550
Pro Val Asp Thr		555
		560

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 5

gccaggccgt gaagcaaata

20

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 6

tcaaagacgc gaaaacat

18

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 7

ccgcgtcagt gcctttgcta t

21

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 8

cgctgtcgga tgcttttatt cac

23

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 9

tcgctttctg gaggggtgc

19

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 10

ccgcaggggc agcagtgg

18



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235*03

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1../1..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)

B0189FR

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

0302021

TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

Méthodes et compositions pour le traitement de pathologies dégénératives oculaires.

LE(S) DEMANDEUR(S) :

EXONHIT THERAPEUTICS SA

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :

1 Nom		SCHWEIGHOFFER
Prénoms		Fabien
Adresse	Rue	38 avenue Paul Déroulède
	Code postal et ville	91430 VINCENNES
Société d'appartenance (facultatif)		
2 Nom		RESINK
Prénoms		Annelies
Adresse	Rue	48 rue Bobillot
	Code postal et ville	75013 PARIS
Société d'appartenance (facultatif)		
3 Nom		DESIRE
Prénoms		Laurent
Adresse	Rue	70 rue de l'Amiral Mouchez
	Code postal et ville	75014 PARIS
Société d'appartenance (facultatif)		

S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.

DATE ET SIGNATURE(S)

DU (DES) DEMANDEUR(S)

OU DU MANDATAIRE

(Nom et qualité du signataire)

19 février 2003

TEZIER HERMAN Béatrice

CPI n°00-10000

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.